



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VLIV CITRULINACE HISTONOVÝCH PROTEINŮ  
NA GENOVOU EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ U BUNĚK  
MYELOIDNÍ ŘADY**

INFLUENCE OF THE CITRULINATION OF HISTON PROTEINS ON THE EXPRESSION OF SELECTED  
GENES IN MYELOID CELLS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Mgr. Kristýna Tučková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

RNDr. Milan Číž, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1384/2018  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Mgr. Kristýna Tučková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **RNDr. Milan Číž, Ph.D.**

Akademický rok: 2018/19

### Název diplomové práce:

Vliv citrulinace histonových proteinů na genovou expresi vybraných genů u buněk myeloidní řady

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. literární zpracování tématiky
2. optimalizace metodik stanovení genové exprese u myeloidních buněk
3. studium vlivu citrulinace histonových proteinů na expresi genů pro vybrané cytokiny
4. vyhodnocení výsledků a jejich shrnutí

### Termín odevzdání diplomové práce: 10. 5. 2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.



Mgr. Kristýna Tučková  
Studentka



RNDr. Milan Číž, Ph.D.  
Vedoucí práce



prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu



prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan

V Brně, dne 31. 1. 2019

## **ABSTRAKT**

Neutrofilní granulocyty jsou důležitými buňkami vrozené imunity a zajišťují obranu organismu před patogeny pomocí různých mechanismů. Jedním z těchto mechanismů je NETóza, při které dochází k uvolnění dekonzenzovaného chromatinu a také citrulinovaných histonových proteinů. Citrulinace je post-translační modifikací, která je katalyzována enzymem peptidylarginindeiminase (PAD) a která vede k přeměně kladně nabitého argininu na neutrální citrulin a může způsobit změny exprese genů pro cytokiny.

Byla stanovována koncentrace prozánětlivých cytokinů (IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) v závislosti na míře citrulinace histonu H3. Stanovení bylo provedeno na úrovni proteinů metodou ELISA a na úrovni mRNA pomocí qPCR. Pro navození citrulinace a aktivaci PAD4 byl použit vápníkový ionofor a pro inhibici sloužily dva inhibitory: Cl-amidine a TDFA.

Bylo zjištěno, že po aktivaci PAD4 docházelo k významnému zvýšení produkce IL-8 a IL-1 $\beta$ . Zvýšení exprese IL-8 bylo rovněž potvrzeno i na úrovni mRNA pomocí qPCR. K inhibici PAD4 a snížení produkce IL-8 a IL-1 $\beta$  docházelo za použití obou inhibitorů. Expresi TNF $\alpha$  se nepodařilo prokázat ani na úrovni proteinů, ani na úrovni mRNA.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Citrulinace, Histon H3, Neutrofil, Cytokiny, Peptidylarginindeiminasa

## **ABSTRACT**

Neutrophils are major cell type of innate immunity, that can eliminate pathogens by different mechanisms. One of these mechanisms is called NETosis, which leads to release of decondensed chromatin and citrullinated histone proteins. Citrullination is post-translational modification catalysed by peptidylarginine deiminase (PAD) and causing transformation of positively charged arginin to neutral citrullin and can change expression of cytokine genes.

Concetrations of pro-inflammatory cytokines (IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) were measured after activation of PAD4 and induction of citrullination. Calcium ionophore was used to induce citrullinaton, Cl-amidine and TDFA were used as inhibitors. Production of cytokines was assessed by ELISA on protein level and by qPCR on mRNA level.

It was found that induction of citrullination led to increased concentrations of IL-8 and IL-1 $\beta$ . Elevated gene expression of IL-8 was confirmed on mRNA level. Both inhibitors were able to decrease level of histone H3 citrullination and IL-8 and IL-1 $\beta$  concentrations. Expression of TNF $\alpha$  was not detected on protein and mRNA level.

## **KEYWORDS**

Citrullination, Histone H3, Neutrophil, Cytokines, Peptidylarginine deiminase

TUČKOVÁ, Kristýna. *Vliv citrulinace histonových proteinů na genovou expresi vybraných genů u buněk myeloidní řady*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/117464>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce RNDr. Milan Číž, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

*Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Milanu Čížovi, Ph.D. za vedení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Adéle Dvořákové, Bc. Veronice Skočkové a Mgr. Petře Dad'ové za jejich ochotu a rady, které mi pomohly při zpracování zadaného úkolu.*

# OBSAH

Úvod .....	8
Teoretická část .....	9
1  Neutrofilní granulocyty .....	9
1.1  Produkce a regulace neutrofilních granulocytů .....	9
1.2  Cesta neutrofilních granulocytů do místa zánětu .....	10
1.3  Mechanismy působení neutrofilních granulocytů .....	11
1.3.1  Fagocytóza .....	12
1.3.2  Tvorba reaktivních kyslíkových forem .....	12
1.3.3  Degranulace .....	13
1.3.4  NETóza .....	14
1.4  Zánik neutrofilů .....	15
2  Cytokiny .....	16
2.1  TNF $\alpha$ .....	16
2.2  IL-1 $\beta$ .....	16
2.3  IL-8 .....	17
3  Citřulinace .....	18
3.1  PAD4 .....	19
3.1.1  Struktura a mechanismus působení PAD4 .....	19
3.1.2  Role PAD v chorobách .....	21
3.1.3  Inhibitory PAD4 .....	21
4  Histonové proteiny .....	23
4.1  Struktura chromatinu .....	23
4.2  Modifikace histonových proteinů .....	24
5  Cíl práce .....	26
Praktická část .....	27
6  Materiál .....	27
6.1  Biologický materiál .....	27
6.2  Použitě chemikálie .....	27
6.3  Příprava pufrů .....	28
6.4  Příprava aktivátoru a inhibitorů .....	29
6.5  Použitě přístroje .....	29
7  Metody .....	30
7.1  Izolace neutrofilů z lidské krve .....	30

7.2	Příprava vzorků pro stanovení exprese cytokinů a míry citrulinace .....	30
7.3	Detekce citrulinace histone H3 pomocí western blotu .....	31
7.3.1	Příprava vzorků pro western blot.....	31
7.3.2	Příprava gelů pro western blot.....	32
7.3.3	Elektroforéza .....	32
7.3.4	Western blot.....	33
7.3.5	Imunodetekce proteinů.....	33
7.4	Stanovení exprese cytokinů pomocí qPCR .....	33
7.4.1	Izolace mRNA z neutrofilů .....	34
7.4.2	Příprava cDNA pro Real-time PCR .....	34
7.4.3	Stanovení genové exprese IL-8 a TNF $\alpha$ pomocí Real-time PCR.....	35
7.5	Stanovení koncentrace proteinů .....	36
7.6	Stanovení exprese vybraných cytokinů metodou ELISA .....	37
8	Výsledky a diskuse.....	38
8.1	Stanovení míry citrulinace histonu H3 pomocí western blotu.....	38
8.2	Stanovení genové exprese vybraných cytokinů .....	41
8.2.1	IL-8 .....	41
8.2.2	TNF $\alpha$ .....	44
8.2.3	IL-1 $\beta$ .....	45
9	Závěr .....	48
	Seznam použitých zdrojů.....	49
	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	60

## ÚVOD

Citrulinace je post-translační modifikací, při které dochází k přeměně kladně nabitého argininu na neutrální citrulin. Tato ztráta náboje může vést ke změnám ve struktuře proteinu, interakci mezi proteiny a ke změnám genové exprese. Citrulinace je spojena s různými fyziologickými procesy, ale i s určitými druhy rakovin nebo s autoimunitními chorobami, mezi které patří například revmatoidní artritida.

Jednou ze skupin proteinů, jejichž genová exprese může být ovlivněna touto post-translační modifikací jsou cytokiny. Tyto proteiny regulují řadu procesů včetně buněčné proliferace, aktivace, diferenciaci a buněčné smrti. Mezi cytokiny patří například chemokiny, které řídí a kontrolují migraci a lokalizaci buněk imunitního systému a jsou zásadní pro jejich správnou funkci. Tato diplomová práce se zaměřuje na změnu exprese prozánětlivých cytokinů (IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) v závislosti na míře citrulinace histonového proteinu H3 u buněk neutrofilních granulocytů.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Neutrofilní granulocyty patří do skupiny polymorfonukleárních leukocytů a jsou efektorovými buňkami vrozené imunity organismů. Tyto buňky hrají důležitou roli při obraně organismu proti extracelulárním patogenům a při akutním zánětu. Pokud patogen překoná fyzikální bariéry organismu a získá přístup do tkání, signály vytvořené mikroby a makrofágy v místě infekce aktivují endoteliální buňky, které následně zachytí neutrofilní granulocyty v jejich blízkosti a směřují je do místa zánětu.

Neutrofilie jsou prvními leukocyty, které se dostávají do místa zánětu a jsou schopny eliminovat patogeny pomocí několika různých mechanismů, mezi které patří například jejich schopnost fagocytózy, NETóza, uvolňování lytických enzymů z granulí a produkce reaktivních kyslíkových forem (ROS), které mají antimikrobiální účinek [1], [2], [3].

Cirkulující neutrofilie tvoří u člověka 50–70 % ze všech leukocytů [4]. Průměr zralých neutrofilů se běžně pohybuje v rozmezí 7–10  $\mu\text{m}$ , mají segmentované jádro a jejich cytoplazma obsahuje granula a sekreční váčky [1]. Dříve byl čas, který neutrofilie stráví v oběhu odhadován na 5–10 hodin, avšak tento odhad byl překonán asi desetkrát, když bylo zjištěno, že život neutrofilů může trvat až 5,4 dní [5].

### 1.1 Produkce a regulace neutrofilních granulocytů

Produkce neutrofilních granulocytů je lokalizována do prostředí kostní dřeně, kde při procesu krvetvorby (hematopoézy) připadají asi dvě třetiny této aktivity na tvorbu monocytů a granulocytů (neutrofilie, eosinofily a bazofily). Neutrofilie vznikají z hematopoetických kmenových buněk, které jsou lokalizovány právě v prostředí kostní dřeně. Toto prostředí je charakteristické přítomností osteoblastů, nízkým průtokem krve a nízkým tlakem kyslíku [6].

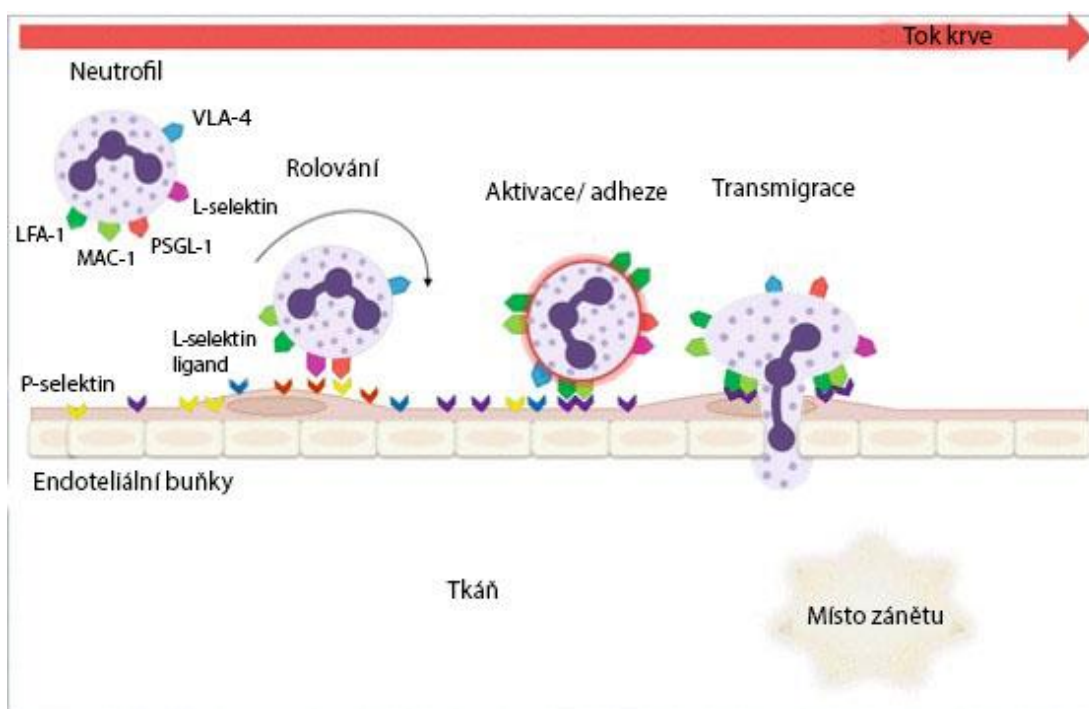
Během jednoho dne může vzniknout u zdravého dospělého člověka až  $2 \times 10^{11}$  buněk neutrofilních granulocytů. Během maturace prochází neutrofil několika vývojovými stádii, které se nazývají myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt neutrofilní tyčka a polymorfonukleární (segmentovaná) buňka [1], [7].

Za obvyklých podmínek dochází k uvolňování pouze zralých neutrofilů z kostní dřeně, které již dále nediferencují. Lokalizace hematopoetických kmenových buněk a ještě ne zcela zralých neutrofilů do prostředí kostní dřeně je umožněna zvláště pomocí perivaskulárních buněk, které exprimují chemokinový receptor CXCR4 [8]. Receptor CXCR4 váže chemokin CXCL12, vysílá retenční signály a po vytvoření zralé myeloidní buňky, jako je například

neutrofilní granulocyt, postupně zmizí. Na rozdíl od tohoto receptoru, CXCR2, receptor pro chemokiny CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 a CXCL8, přenáší signály a jeho množství se v průběhu času postupně zvyšuje, což vede k uvolňování myeloidních buněk z kostní dřeně [9].

## 1.2 Cesta neutrofilních granulocytů do místa zánětu

Přesun neutrofilních granulocytů do místa zánětu obecně zahrnuje následující kroky: zachycení neutrofilů na endoteliu pomocí selektinu, rolování, zpomalení a následnou adhezi, která je zprostředkována integriny a v posledním kroku dochází k transmigraci neutrofilů do poškozené tkáně [10], [11]. Schématické znázornění tohoto procesu zobrazuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Migrace neutrofilu do místa zánětu. Přesun neutrofilu zahrnuje kroky rolování, adheze a transmigrace. Buňky jsou na endoteliu zachytávány pomocí selektinu (převzato a upraveno dle [12]).

Tato kaskáda je započata změnami povrchu endothelia, které jsou způsobeny zánětlivými mediátory zahrnujícími například histamin a cytokiny. Tyto mediátory jsou uvolňovány buňkami leukocytů v případě, že dojde k jejich kontaktu s patogeny [13], [10], [14].

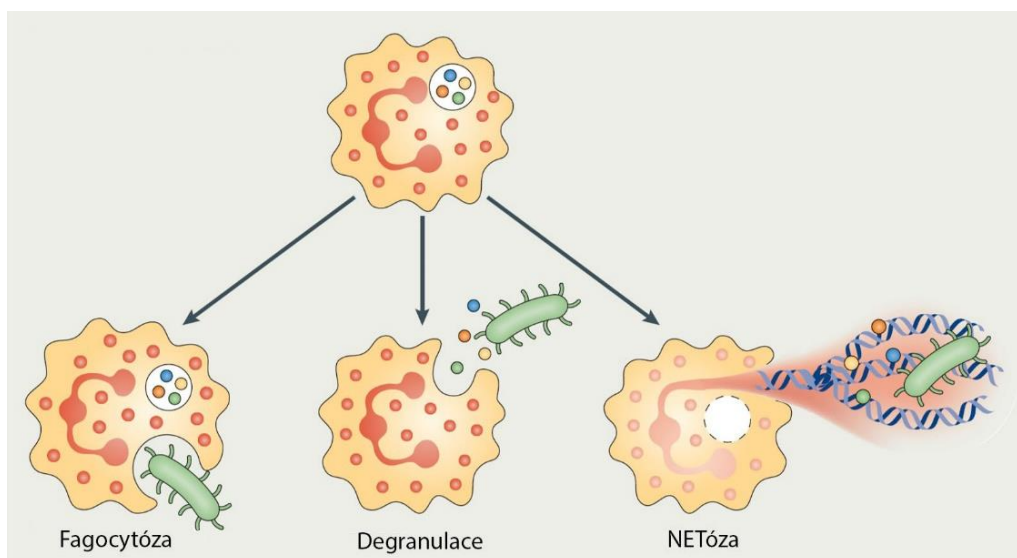
Rolování neutrofilů je umožněno jejich kontaktem s endoteliem, na jehož povrchu se nacházejí selektiny. Úplná aktivace může být dvoukrokový proces iniciovaný prozánětlivými cytokiny, jako je například tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Druhou možností je kontakt s aktivovanými endoteliálními buňkami, který je následován

vystavením neutrofilu molekulárním strukturám typickým pro povrch buněk patogeních mikroorganismů, chemoatraktantům nebo růstovým faktorům [15]. Tento proces je nezbytný pro co nejvyšší stupeň degranulace neutrofilů a pro tvorbu reaktivních kyslíkových forem [15], [16].

Při procesu aktivace neutrofilů a jejich chemotaxe do místa zánětu hrají klíčovou roli ELR-CXC chemokiny, které ve své struktuře obsahují specifický motiv glutamát-leucin-arginin, jež je přítomný ihned před CXC motivem. Mezi tyto chemokiny patří CXCL8 (rovněž známý jako IL-8), CXCL2 a CXCL5. Úkolem těchto chemokinů je přenos signálu pomocí receptoru CXCR2, a tím aktivace neutrofilů a jejich adheze k endotelu [17], [18].

### 1.3 Mechanismy působení neutrofilních granulocytů

Existují tři základní mechanismy, pomocí kterých neutrofilní granulocyty zajišťují obranu proti extracelulárním patogenům. Přehled těchto mechanismů zobrazuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Mechanismy neutrofilních granulocytů pro obranu proti extracelulárním patogenům (převzato a upraveno dle [19]).

Mezi tyto mechanismy patří schopnost fagocytózy, degranulace neutrofilních granulocytů a proces NETózy [1], [2], [3].

### 1.3.1 Fagocytóza

Buňky vyvinuly mnoho způsobů, pomocí kterých jsou schopny pohlcovat částice a rozpuštěné látky. Mezi tyto mechanismy patří například pinocytóza, endocytóza nebo také fagocytóza.

Fagocytóza je proces, při kterém dochází k rozpoznání a pohlcení mikroorganismů, zbytků tkání a částic, které jsou akumulovány během infekce, zánětu nebo při hojení ran. Tento způsob obrany proti patogenům je nejefektivněji uskutečňován fagocytujícími buňkami, mezi které patří například právě neutrofilní granulocyty. Fagocytóza je zásadním mechanismem zajišťujícím eliminaci patogenů a obnovení homeostázy v místě zánětu nebo infekce. Tento proces je rovněž velmi důležitý u buněk monocytů a makrofágů pro indukci specifické imunitní odpovědi, protože je nezbytný pro prezentaci antigenu a aktivaci T-lymfocytů. Fagocytóza je primárně mechanismus zajišťující destrukci patogenu uvolňováním lysozomálních enzymů a tvorbou reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého [20].

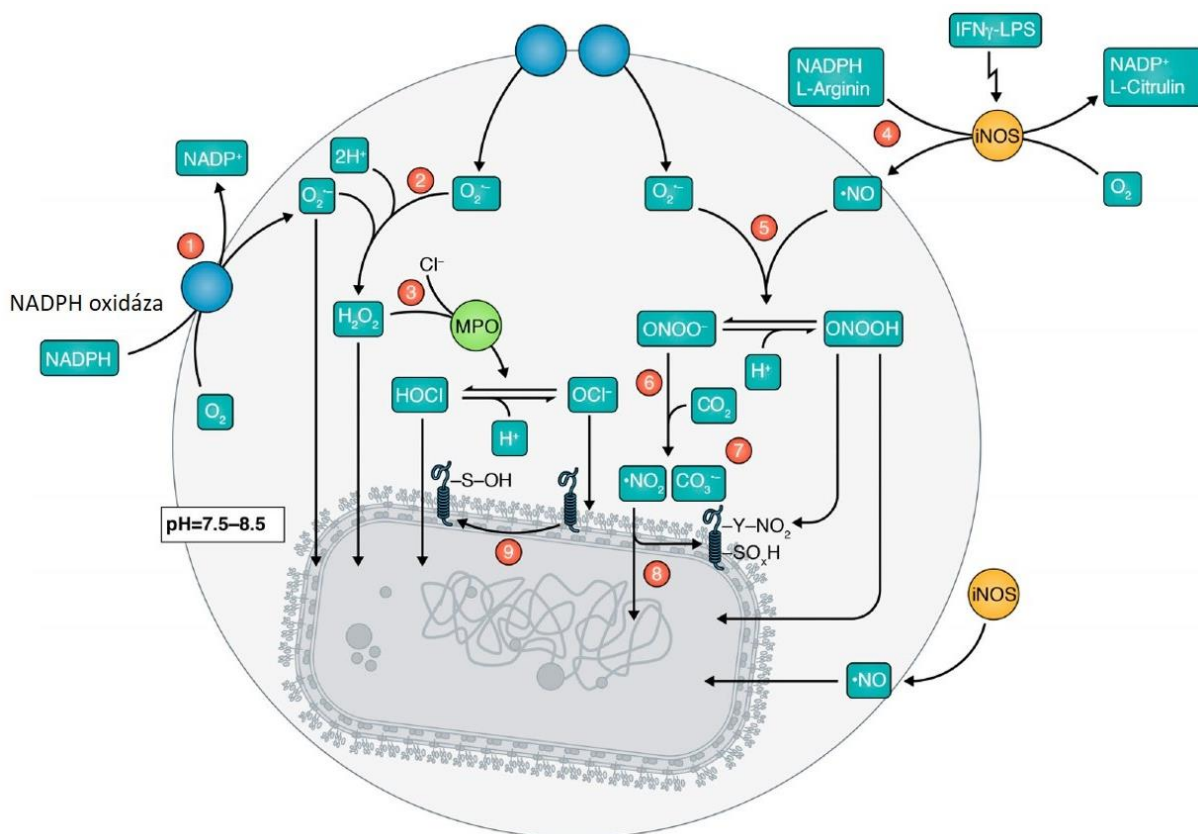
### 1.3.2 Tvorba reaktivních kyslíkových forem

Fagocyty produkují ROS primárně za účelem boje s invadujícími bakteriemi, houbami nebo prvoky. Znázornění mechanismu produkce ROS zobrazuje Obrázek 3. Enzymem zodpovědným za tvorbu ROS je NADPH oxidasa. Tento enzymový komplex není v buňce sestaven, dokud není vyžadována jeho aktivita. Rozpoznání a pohlcení patogenu vede k aktivaci NADPH oxidasy, díky které dochází k redukci molekul  $O_2$  na  $O_2^{\bullet-}$  radikály, které přímo likvidují pohlcenou patogenní částici. Ekvivalenty potřebné pro redukci pocházejí z NADPH, které je tvořeno v pentózofosfátovém cyklu [21], [22], [23]. Elektrony jsou přenášeny z NADPH na molekuly  $O_2$ , zatímco protony proudí napětově řízenými iontovými kanály, čímž je udržována aktivita NADPH oxidasy [24], [25].

Radikály  $O_2^{\bullet-}$  mohou být za využití  $H^+$  přeměněny na  $H_2O_2$  a  $O_2$ . Tato reakce je v kyselém prostředí velmi rychlá a může probíhat ještě o dva řády rychleji v přítomnosti superoxid dismutasy [26], [27]. U neutrofilních granulocytů je pH fagosomu v prvních chvílích po pohlcení patogenu alkalické (pH ~7,5–8,5) a během jedné hodiny poklesne na pH ~6–6,5 [28].

Kyselina chlorná (HOCl) je syntetizována neutrofilní myeloperoxidasou (MPO). Tento enzym je uložen v azurofilních granulích neutrofilních granulocytů a po aktivaci neutrofilů se uvolňuje do fagosomů a extracelulárního prostředí. MPO reaguje s  $H_2O_2$  a za přítomnosti chloridu dochází ke vzniku HOCl. Tato kyselina je hlavním oxidačním

činnidlem syntetizovaným v buňkách neutrofilních granulocytů, které může dále reagovat s aminy za vzniku chloraminů. Tyto chloraminy se mohou dostávat do patogenů, kde mohou interagovat s mnohem větší selektivitou než HOCl a jsou déle účinkujícími a efektivnějšími toxikanty [29], [30].



Obrázek 3: Tvorba ROS neutrofilními granulocyty ve fagosomu. Hlavním oxidačním činidlem syntetizovaným buňkami neutrofilů je HOCl (3). Tvorba •NO de novo (4) není u neutrofilů příliš běžná (převzato a upraveno dle [31]).

### 1.3.3 Degranulace

Degranulace je procesem exocytózy antimikrobiálních nebo cytotoxických molekul z intracelulárních granul do extracelulárního prostředí nebo fagosomu. Tento proces hraje důležitou roli při přeměně neaktivního cirkulujícího neutrofilu na plně aktivovanou buňku schopnou cílené migrace, fagocytózy a usmrcení patogenu [32]. Během procesu degranulace dochází k fúzi cytoplazmatických granul s buněčnou membránou a následnému uvolnění jejich obsahu do extracelulárního prostředí. Lidské neutrofilní granulocyty jsou vybaveny třemi

základními typy cytoplazmatických granul, které ovlivňují funkci buňky: primární (azurofilní), sekundární (specifická) a terciární granula [33], [34].

Neutrofilny rovněž obsahují membránově vázané organely nazvané jako sekreční váčky, které vznikly procesem endocytózy. Jejich membrána je bohatá na receptory, signální proteiny a adhezivní molekuly, zatímco jejich vnitřním obsahem je plazma [35].

Azurofilní, specifická a terciární granula obsahují různé enzymy a proteiny určené na obranu proti patogenům a jejich membrána je tvořena signálními proteiny, receptory, adhezivními molekulami a enzymy [35], [36].

Azurofilní granula obsahují MPO, serinové proteasy, katepsin G, neutrofilní elastasu (NE) a  $\alpha$ -defensiny. Specifická granula jsou tvořena antimikrobiálními proteiny a peptidy, mezi které patří například laktoferin, katelicidin, pentraxin a haptoglobin, a rovněž obsahují některé metaloproteinasy. Želatinázová granula jsou tvořena gelatinasou, lysozymem a také některými metaloproteinasy [37], [38].

Míra mobilizace těchto granul závisí na intenzitě stimulu, avšak pořadí jejich mobilizace je dané. Nejprve jsou mobilizována terciární granula, poté specifická a jako poslední jsou mobilizována azurofilní granula. Dochází k postupnému přidávání proteinů z membrány granulí k cytoplazmatické membráně a k uvolnění vnitřního obsahu granulí do extracelulárního prostředí. Řízená exocytóza granulí neutrofilních granulocytů umožňuje cílené doručení toxických granulárních proteinů do místa potřeby, a tím zamezuje poškození zdravé tkáně [39], [40].

#### **1.3.4 NETóza**

Až do roku 2004 byla za hlavní mechanismus eliminace patogenů neutrofilními granulocyty považována fagocytóza a následné zneškodnění patogenu pomocí ROS a proteas uvnitř fagolysozomu. Tento koncept změnil Brinkmann spolu se svými kolegy, když zjistili, že neutrofilny po stimulaci forbol-12-myristát-13-acetátem (PMA) uvolňují struktury, které jsou tvořeny dekonzenzovaným chromatinem, histonovými proteiny, granulárními proteiny, NE, MPO a katepsinem G. Tyto struktury byly nazvány jako neutrofilní extracelulární pasti (NETs) a byly poprvé popsány jako alternativní obranný mechanismus, pomocí kterého jsou neutrofilny schopné zachytit a případně usmrtit mikroby [3].

Stimulace pomocí PMA vede k uvolnění NETs do extracelulárního prostředí, které je doprovázeno lyzí neutrofilu. Díky tomuto zjištění byla NETóza popsána jako programovaná buněčná smrt, která se odlišuje od apoptózy a nekrózy a je závislá na tvorbě ROS

NADPH oxidasou. Při takto indukované tvorbě NETs je hlavním zdrojem DNA v těchto strukturách jádro neutrofilu [41].

Při tomto procesu dochází k aktivaci NADPH oxidasy přes PKC a Raf-MEK-ERK signální dráhu a následné produkci ROS. Tím je aktivována peptidylarginindeiminasa 4 (PAD4), která hypercitrulinuje arginin v histonových proteinech, což způsobuje dekonkondenzaci chromatinu [42], [43]. Zároveň je uvolňována MPO a NE z azurofilních granul [44]. Bylo zjištěno, že MPO se váže na chromatin a aktivuje NE, která degraduje aktinová filamenta v cytoplazmě a poté je translokována do jádra a štěpí histonové proteiny [45]. Následně dochází k rozrušení jaderného obalu, uvolnění chromatinu do cytosolu a jeho smísení s proteiny cytosolu [41]. Lyze buňky a uvolnění NETs jsou zprostředkovány pomocí gasderinu D, který je NE štěpen na svoji aktivní formu [46]. Aktivovaný gasderin D vytváří póry v plasmatické membráně a v granulárních membránách a způsobuje uvolnění obsahu buňky do extracelulárního prostředí [47].

Avšak tvorba NETs nemusí být vždy spojena s lyzí neutrofilů. Bylo zjištěno, že aktivace neutrofilů pomocí bakterií, lipopolysacharidu (LPS), IL-8 nebo nízkých koncentrací PMA, může vést k uvolnění DNA a tvorbě NETs nezávisle na buněčné smrti [48]. V tomto případě je zdrojem DNA uvolněné ve strukturách NETs mitochondriální DNA (mtDNA) [49]. Všechny typy granulocytů (neutrofilů, eozinofilů a basofilů) mohou tímto způsobem uvolňovat mtDNA, a tak vytvářet NETs, které umožňují zachycení a likvidaci bakterií bez buněčné smrti [50], [51]. Uvolňování mtDNA neutrofilů a eozinofilů bylo rovněž pozorováno *in vivo* [50], [52].

## 1.4 Zánik neutrofilů

Za fyziologických podmínek jsou neutrofilní granulocyty odstraňovány z krevního oběhu převážně v játrech, slezině a v kostní dřeni [53], [54].

U starých neutrofilů dochází ke zvýšené expresi chemokinového receptoru CXCR4, pomocí kterého jsou neutrofilů pravděpodobně směřovány zpět do kostní dřeni, kde poté dochází k jejich apoptóze a eliminaci makrofágy [15].

Neutrofilů mohou rovněž zanikat ve vaskulárním systému, ze kterého jsou následně odstraňovány pomocí Kupfferových buněk imobilizovaných v játrech [54]. Takto mohou být eliminovány jak senescentní neutrofilů [53], tak i neutrofilů které zahynuly při boji s infekcí [54].

## 2 CYTOKINY

Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které řídí a kontrolují migraci a lokalizaci buněk imunitního systému a tvoří největší rodinu cytokinů. Správná funkce chemokinů je zásadní pro pohyb všech imunitních buněk, od migrace potřebné k vývoji imunitní buňky a k homeostáze až po vyvolání primární a humorální imunitní odpovědi a migraci imunitních buněk do místa poškození nebo zánětu. Vazbou na příslušné receptory na cílových buňkách v jejich bezprostřední blízkosti, mohou tyto krátce žijící malé proteiny regulovat řadu procesů včetně buněčné proliferace, aktivace, diferenciaci a buněčné smrti [55].

Pro tuto práci byly vybrány tři cytokiny, které jsou produkovány buňkami neutrofilních granulocytů: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-8. Tyto cytokiny mohou přispívat k zánětlivým a destruktivním procesům při RA, mohly by tudíž v budoucnu být zajímavými terapeutickými cíli při léčbě této nemoci. Mnoho studií potvrdilo expresi prozánětlivých cytokinů v synoviální tkáni při revmatoidní artritidě (RA) bez ohledu na délku trvání nemoci, její vážnost nebo léčbu [55].

### 2.1 TNF $\alpha$

Buňky neutrofilních granulocytů migrují krevním oběhem do místa zánětu, kdy nejprve interagují a migrují skrze aktivované endothelium. Endotheliální buňky jsou aktivovány lokální produkcí prozánětlivých cytokinů, jako jsou například TNF, IL1 a IL17. Tato aktivace vede k expresi P-selektinů, E-selektinů a integrinů, které vážou buňky neutrofilů, zpomalují jejich pohyb a způsobují jejich rolování po endotheliu.

TNF $\alpha$  zaujímá zásadní roli při regulaci tvorby prozánětlivých cytokinů. Jako pleiotropní cytokin, který může zvyšovat synoviální proliferaci a produkci prostaglandinů a metaloproteinů, a který rovněž může regulovat cytokinové dráhy, je TNF $\alpha$  považován za potenciální terapeutický cíl při léčbě RA [56], [57], [58].

### 2.2 IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  je prozánětlivý cytokin, který rovněž hraje důležitou roli při průběhu RA a spolu s TNF $\alpha$  patří mezi hlavní cytokiny podílejícími se destruktivních procesech probíhajících při tomto onemocnění.

Tento cytokin je také spolu IL-6 zodpovědný za migraci buněk a zánětlivé procesy probíhající při RA [59]. Cytokin IL-1 $\beta$  se spolu s TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-17 rovněž podílí na tvorbě osteoklastů, které jsou hlavními buňkami odstraňujícími kostní hmotu a nacházejícími se v synoviálních membránách pacientů trpících RA [60], [61].



## 2.3 IL-8

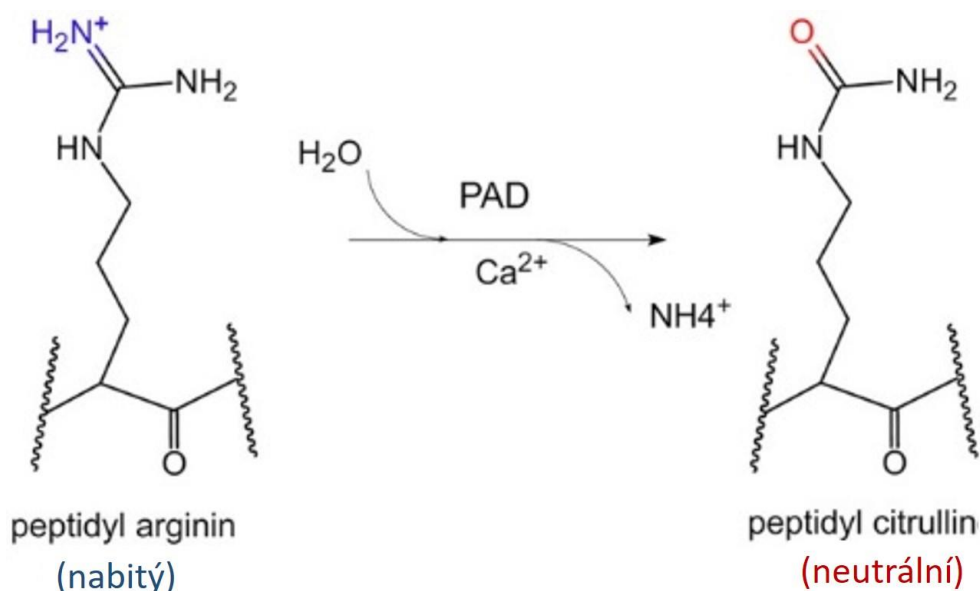
Cytokin IL-8 patří mezi silné chemotaktické faktory neutrofilních granulocytů a je rovněž zánětlivým mediátorem. Exprese IL-8 může být vyvolána různými prozánětlivými signály, kterými mohou být například LPS, TNF a IL-1 [62].

Bylo potvrzeno, že IL-8 selektivně působí na neutrofilní granulocyty, zatímco monocyty nejsou ovlivňovány jeho chemotaktickým gradientem. Tento chemotaktický cytokin se podílí na aktivaci neutrofilů, která se projevuje degranulací a produkcí superoxidového aniontu [63]. K aktivaci neutrofilu dochází po vazbě na neutrofilní receptory s vysokou afinitou k IL-8 [64]. Schopnost IL-8 aktivovat buňky neutrofilních granulocytů se projevuje při jeho koncentraci od 0,1 – 10 nM [65].

### 3 CITRULINACE

Citrulinace proteinů patří mezi post-translační modifikace (PTM), které je v poslední době věnována zvláštní pozornost. Citrulin je nestandardní aminokyselina, která není do struktury proteinu inkorporována během procesu translace. Jelikož pro citrulin neexistuje žádná tRNA a není geneticky kódovanou aminokyselinou, je zřejmé, že přítomnost citrulinu v proteinech musí být způsobena post-translační modifikací. V roce 1977 bylo zjištěno [66], že za tuto modifikaci jsou zodpovědné enzymy z rodiny PAD.

Tato modifikace je procesem, při kterém dochází k odstranění aminoskupiny na argininu, a tím jeho přeměně na citrulin. Citrulinace je provázena ztrátou elektrostatického náboje, která může mít dramatický dopad na strukturu proteinu [67], interakce mezi proteiny a buněčnou signalizaci [68]. Schématické znázornění procesu citrulinace zobrazuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Schématické znázornění procesu citrulinace. Při tomto procesu dochází k deiminaci peptidyl argininu a vzniku peptidyl citrulinu za ztráty elektrostatického náboje. Tato reakce je katalyzována PAD enzymy (převzato a upraveno dle [69]).

PAD jsou enzymy, které katalyzují přeměnu argininu na nestandardní aminokyselinu citrulin. V současné době je známo pět genů, kódujících vysoce konzervované savčí izoformy tohoto enzymu: PAD 1-4 a PAD6 [70], [71], [72].

Zatímco primární struktura těchto enzymů je vysoce konzervovaná, exprese jednotlivých PAD enzymů je tkáňově specifická. Není známo příliš mnoho informací o specifitě PAD

enzymů k různým proteinovým substrátům. Bylo zjištěno, že všechny izoformy mohou *in vitro* citrulinovat většinu proteinů, které mají přístupná argininová rezidua [73].

Aktivita všech těchto enzymů velmi silně závisí na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, bez kterých není přeměna L-argininu na L-citrulin možná [74]. Jelikož jsou koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu a nukleoplazmě za fyziologických podmínek relativně nízké a pohybují se v rozmezí  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  M, tak by PAD enzymy měly zůstat za těchto podmínek neaktivní. Tyto enzymy jsou aktivovány za extrémních podmínek, například pokud dochází k poškození a umírání buněk, kdy se zvýší koncentrace vápenatých iontů díky jejich přítoku z extracelulárního prostředí a jejich uvolnění z intracelulárních zásob [75].

Je známo mnoho proteinů, které jsou substráty PAD enzymů, ale nejlépe charakterizovanými proteiny podléhajícími citrulinaci jsou histony. Histony mohou být citrulinovány na řadě míst a tyto PTMs mohou vést k aktivaci nebo represí genové exprese [76].

Citrulinace histonů hraje důležitou roli například při apoptóze, která je indukovaná poškozením DNA, nebo při procesu NETózy [3], [77].

### 3.1 PAD4

Enzym PAD4 je ze všech enzymů z rodiny peptidylarginindeiminas nejlépe popsán a jeho fyziologické funkce jsou i díky určení jeho krystalové struktury nejlépe charakterizovány. Izoenzym PAD4 je exprimován v jádře a cytoplazmatických granulích diferencovaných neutrofilů a hraje roli při tvorbě NETů. Tento enzym rovněž ovlivňuje genovou expresi svojí schopností deiminovat histonové proteiny H2A, H3 a H4 [78].

#### 3.1.1 Struktura a mechanismus působení PAD4

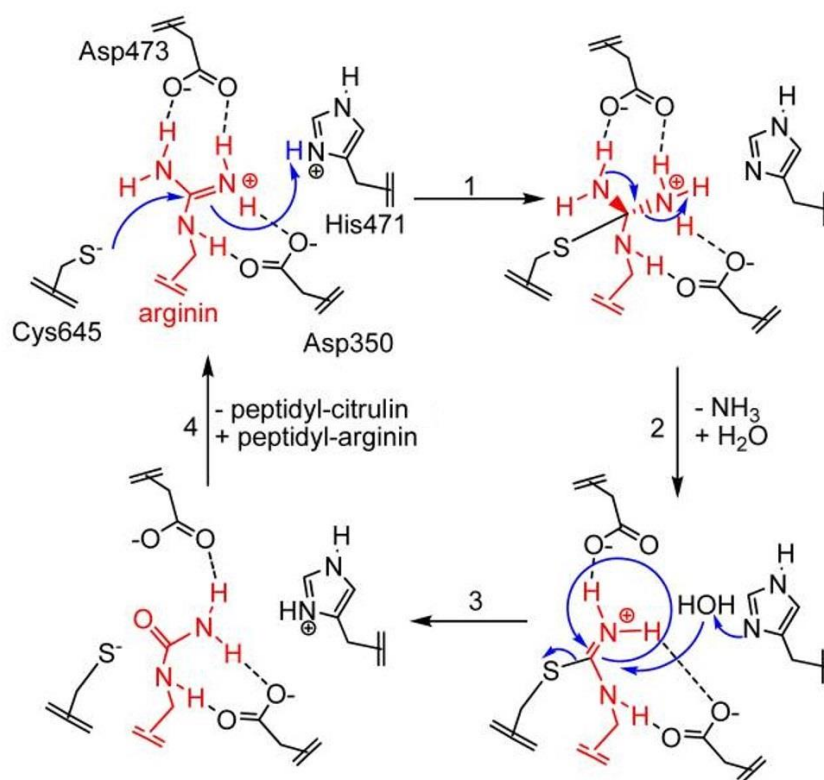
Všechny savčí PAD izoenzymy sdílejí 50–70% sekvenční homologii, jejich délka se pohybuje okolo 663 AA a molekulová hmotnost okolo 74 kDa [79], [80], [81].

Struktura těchto enzymů je tvořena dvěma immunoglobulin-like subdoménami nacházejícími se v N-terminální části (AA 1–300) a vysoce konzervovanou C-terminální doménou (AA 301–663), která zahrnuje aktivní místo enzymu [79]. Izoenzym PAD4 ve své struktuře rovněž obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS), který se nachází v N-terminální doméně. Díky tomuto NLS je PAD4 lokalizována do jádra, kde katalyzuje deiminaci histonů H3 a H4 [79], [82].

Enzym PAD4 obsahuje pět vazebných míst pro  $\text{Ca}^{2+}$  z nichž dvě jsou lokalizována v C-terminální doméně a zbylé tři v N-terminální části. V nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je struktura

aktivního místa enzymu spíše otevřená a obsahuje vysoce kyselou oblast, ve které se nachází nukleofilní Cys645, který je směřován ven z aktivního místa. Poté co dojde k navázání  $\text{Ca}^{2+}$ , prochází protein řadou konformačních změn, díky nimž se klíčová rezidua aktivního místa (včetně Cys645) dostanou do pozice, ve které jsou schopné katalyzovat deiminační reakci [79], [81]. Aktivita PAD4 je nezávislá na pH, které se pohybuje v rozmezí 6,0–8,5 [83].

Arita a jeho kolegové [79] popsali mechanismus, podle kterého pravděpodobně dochází k deiminační reakci. Tento mechanismus zobrazuje Obrázek 5. Pro katalýzu této reakce jsou zásadní čtyři rezidua: D350, H471, D473 a C645. Deiminace začíná nukleofilním atakem cysteinu z aktivního centra enzymu, C645, na uhlík nacházející se ve struktuře guanidinu. Tímto způsobem vzniká tetrahedrální intermediát, který se následně rozpadá za tvorby dalšího intermediátu, jehož hydrolýza vede k tvorbě citrulinu. Protonace uvolněného amoniaku je umožněna histidinem H471. Dva aspartáty D350 a D473 napomáhají orientovat guanidinovou skupinu a umožnit nukleofilní atak [83], [79], [84].



Obrázek 5: Navržený mechanismus citrulinace katalyzované enzymem PAD4 (převzato a upraveno dle [75]).

### 3.1.2 Role PAD v chorobách

Citrulinace fibrinogenu, filaggrinu, kolagenu, aktinu, keratinu,  $\beta$ -tubulinu a myelinového bazického (MBP) proteinu je spojena s různými fyziologickými procesy, stejně tak jako s autoimunitními chorobami a určitými druhy rakovin.

Citrulinace je zásadním dějem, ke kterému dochází při RA. Během tohoto onemocnění uvolňují buňky neutrofilních granulocytů do kloubů PAD enzymy, které zde citrulinují fibrinogen, filaggrin, kolagen,  $\alpha$ -enolasu a vimentin. Tyto citrulinované proteiny jsou následně rozpoznávány protilátkami proti citrulinovaným proteinům (ACPA), což vede k produkci prozánětlivých cytokinů a další mobilizaci buněk imunitního systému, které dále uvolňují PAD enzymy do kloubů [85], [86], [87], [88].

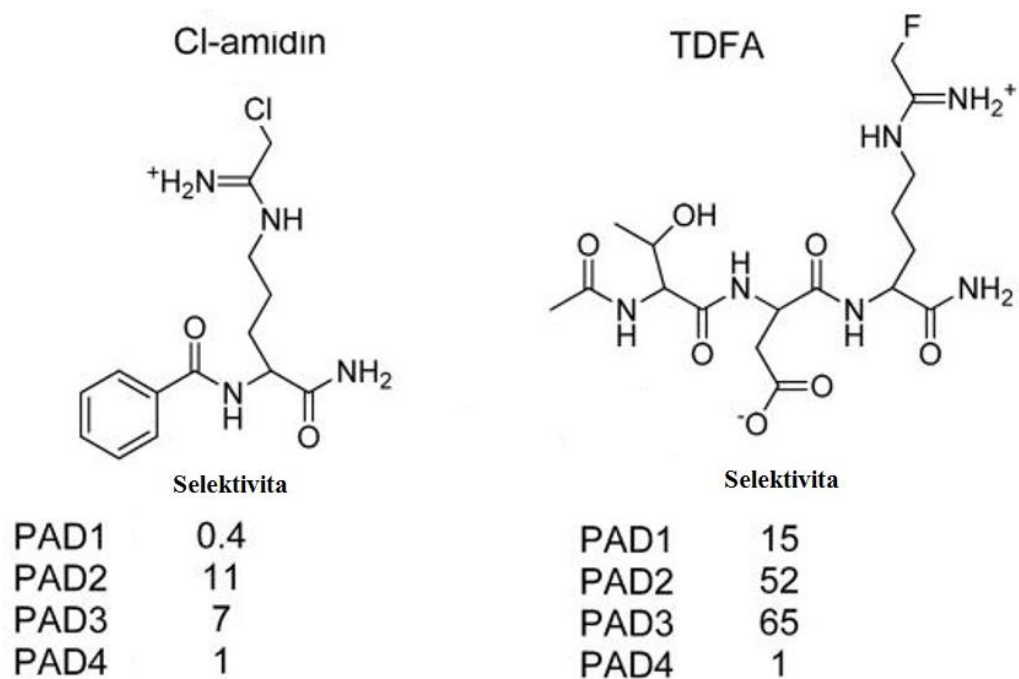
Dalším onemocněním, při kterém hraje PAD4 důležitou roli je roztroušená skleróza. Hypercitrulinace MBP pomocí enzymů PAD2 a PAD4 způsobuje jeho proteolýzu a degradaci myelinové vrstvy, zpomaluje přenos signálů a nakonec vede k rozvoji roztroušené sklerózy [89], [90].

Ke zvýšené expresi PAD4 dochází rovněž u řady maligních tumorů, ale nedochází k ní u benigních tumorů. Toto zjištění naznačuje možnou roli dysregulované PAD4 při vývoji tumorů. Hladina PAD4 je rovněž zvýšena v krvi pacientů s maligními tumory a po resekci dochází k jejímu poklesu [91].

### 3.1.3 Inhibitory PAD4

Díky roli PAD4 při řadě různých onemocněních, roste zájem vytvářet inhibitory tohoto enzymu. V minulých letech byla vyvinuta řada PAD inhibitorů, ale většina těchto molekul je relativně slabými inhibitory těchto enzymů.

Luo a jeho kolegové vyvinuli silné inhibitory PAD4. Nejlepšími vybranými sloučeninami byly Cl-amidine a F-amidine. Tyto inhibitory inaktivují enzymy alkylací cysteinu C645, která byla krystalograficky potvrzena [92]. Tyto sloučeniny jsou analogy benzoyl-argininu, který je zatím nejmenším charakterizovaným substrátem [83]. Strukturu Cl-amidinu zobrazuje Obrázek 6.



Obrázek 6: Struktura inhibitorů PAD enzymů – Cl-amidinu a TDFA (převzato a upraveno dle [75]).

Rovněž byl objeven tripeptid (Thr-Asp-F-amidine; TDFA), který je vysoce selektivním ireverzibilním inhibitorem PAD4. Tento inhibitor je odvozen ze struktury dříve známého Cl-amidinu [93]. Strukturu TDFA zobrazuje Obrázek 6.

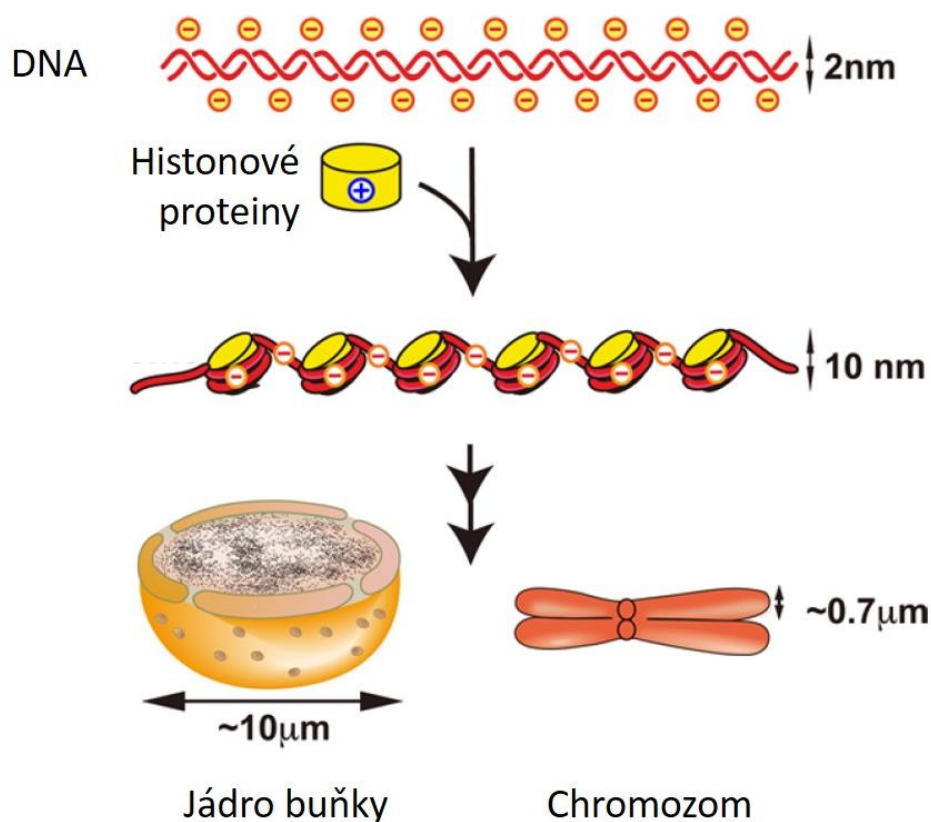
V případě inhibice enzymu PAD4, nedochází k citrulinaci histonového proteinu H3 a tvorbě NETů, které tyto citrulinované histony obsahují.

## 4 HISTONOVÉ PROTEINY

### 4.1 Struktura chromatinu

Genetická informace eukaryotické buňky je uložena ve formě molekul DNA, jejichž délka v lidské buňce dosahuje až 2 m v jádře buňky o průměru přibližně 10  $\mu\text{m}$ . Po replikaci se délka DNA obsažené v buňce ještě zdvojnásobí. Z těchto důvodů mají buňky vyvinutý sofistikovaný mechanismus, jak organizovat a chránit svoji DNA.

Jednou z možností, jak organizovat záporně nabitou genomickou DNA v jádře, je využití tohoto náboje k interakci s kladně nabitými proteiny (Obrázek 7). Tyto kladně nabité proteiny se nazývají histony a u eukaryotických organismů vytvářejí proteinový komplex interagující s DNA. Tento proteinový komplex v interakci s DNA se nazývá chromatin.



Obrázek 7: Organizace chromatinu. Chromatin je tvořen DNA a histony a vytváří 10 nm vlákno, které je dále uspořádáno do struktury chromozomu (převzato a upraveno dle [94]).

Základní úrovní organizace chromatinu je nukleosom tvořený dvěma kopiemi každého histonu H2A, H2B, H3 a H4, které jsou uspořádány do histonového oktameru, okolo kterého je ovinuto 146–147 bp vlákna DNA. Histonový oktamer je tvořen centrálním heterotetramerem

histonů H3 a H4, ke kterému jsou připojeny dva heterodimery tvořené histony H2A a H2B. [95], [96]. Nukleosomy se v chromatinu vyskytují v přibližně pravidelných intervalech a jsou spojeny krátkými úseky linkerové DNA o průměrné délce okolo 60 bp. Takto je tvořeno dlouhé vlákno nukleosomů, které dosahuje šířky přibližně 10 nm [97], [98], [99]. Linkerová DNA je vázána na histon H1, který stabilizuje vazbu DNA na histonový oktamer [100], [101].

Struktura chromatinu a jeho domén řídí replikaci DNA i genovou expresi. Histonové proteiny jsou charakteristické přítomností N-terminálních konců o variabilní délce, na kterých dochází k četným PTM. Tyto modifikace hrají důležitou roli při procesech transkripční aktivace, umlčování, organizaci chromatinu a replikaci DNA [102].

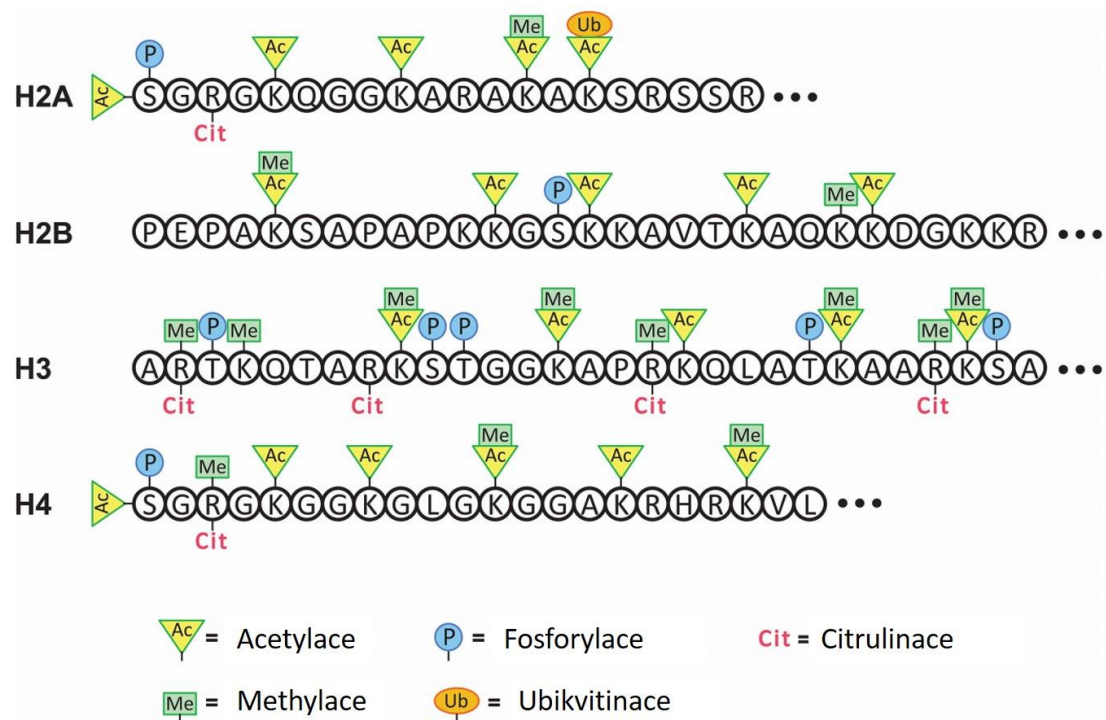
## **4.2 Modifikace histonových proteinů**

Epigenetická regulace genové exprese je nepostradatelným mechanismem pro správnou funkci eukaryotických buněk. Dysregulace tohoto mechanismu může být příčinou vzniku mnoha chorob. Tento regulační mechanismus je aspoň z části kontrolován pomocí celé řady PTM histonových proteinů [103].

Histony jsou předmětem obrovského počtu PTM, které zahrnují acetylaci, methylaci lysinů a argininů, fosforylaci serinů a threoninů, ubikvitinaci a sumoylaci lysinů a také ribosylaci. Pro ještě větší zvýšení komplexity může navíc každý lysin přijmout až tři methylové skupiny a arginin může podléhat mono- nebo di-methylaci. K většině PTM dochází na N-terminálních nebo C-terminálních částech histonových proteinů [102].

Tyto vyčnívající N-konce histonových proteinů jsou bohaté na aminokyseliny lysin a arginin [95] a z tohoto důvodu jsou zásadními pro regulaci genové exprese. Jelikož argininová rezidua hrají důležitou roli při vazbě DNA a při protein-proteinových interakcích není překvapivé, že podléhají mnoha PTM. Přehled základních PTM, které mohou probíhat na N-koncích histonových proteinů uvádí Obrázek 8.





Obrázek 8: Přehled PTM probíhajících na N-koncích histonových proteinů bohatých na arginin a lysin (převzato a upraveno podle [104]).

V současné době jsou známy čtyři různé typy enzymatických modifikací argininu: methylase, citrulinace, fosforylace a ADP-ribosylace [105], [76].

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zhodnocení vlivu citrulinace histonového proteinu H3 u buněk neutrofilních granulocytů na expresi genů prozánětlivých cytokinů IL-8, TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Pro splnění tohoto cíle byly provedeny následující dílčí kroky:

- Porovnání míry citrulinace histonu H3 po aktivaci pomocí CaI a inhibici Cl-amidinem a TDFA
- Stanovení genové exprese cytokinů na úrovni mRNA pomocí qPCR
- Stanovení produkce cytokinů na úrovni proteinů pomocí metody ELISA
- Analýza a statistické zpracování získaných výsledků

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 6 MATERIÁL

### 6.1 Biologický materiál

Žilní krev od zdravých dárců (odebírána do citrátu sodného)

### 6.2 Použité chemikálie

- Akrylamid/Bis-akrylamid, 30% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- Anti-mouse IgG značená křenovou peroxidasou (Cell Signaling Technology, USA)
- Anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) protilátka (5103) ChIP Grade (Abcam, Velká Británie)
- Anti-rabbit IgG značená křenovou peroxidasou (Cell Signaling Technology, USA)
- BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A, B (Pierce, USA)
- Calcium Ionophore A23187, C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- CatchGene<sup>®</sup> Cell/Tissue RNA Kit
- Citrát sodný; 3,8% (Lachema, Česká republika)
- Cl-Amidine (trifluoroacetate salt), C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>•CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (Cayman Chemical, USA)
- cOmplete<sup>TM</sup> ULTRA Tablets Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Německo)
- Dextran T 500 – *Leuconostoc Mesenteroides* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- Human IL-1beta Uncoated ELISA Kit (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Human IL-8 Uncoated ELISA Kit (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Human TNFα ELISA Ready-SET-Go! (Affymetrix, USA)
- β-merkapt ethanol (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Protein ladder 26620 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- SuperSignal West Femto a Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, (Thermo Fischer Scientific, USA)

- TDFA (trifluoroacetate salt),  $C_{17}H_{29}FN_6O_7 \cdot xC_2HF_3O_2$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine),  $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, USA)
- TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- TWEEN-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- Želatina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)

### 6.3 Příprava pufrů

- **Elektroforetický pufr** (5× koncentrovaný) – na 1 l roztoku: 15,25 g TRIS; 72,1 g glycinu; 5 g SDS rozpuštěno v destilované vodě, pH 8,3 (používá se 1× koncentrovaný)
- **Fosfátový pufr PBS** – na 1 l roztoku: 0,2 g KCl; 8 g NaCl; 0,2 g  $KH_2PO_4$ ; 2,3 g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  rozpuštěno v destilované vodě, pH 7,5
- **HBSS** (Hank's Balanced Salt Solution) – na 1 l roztoku: 0,4 g KCl; 0,06 g  $KH_2PO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,8 g NaCl; 0,35 g  $NaHCO_3$ ; 0,12 g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ; 1 g glukosy; 0,14 g  $CaCl_2$  rozpuštěno v destilované vodě, pH 7,4
- **IP pufr** – na 100 ml roztoku: 316 mg TRIS-HCl (pH 8,0); 0,88 g NaCl; 0,292 g EDTA; 0,2 ml Triton X-100; 0,2 ml Igepal (NP-40) rozpuštěno v destilované vodě, rozplněno po 10 ml a roztok uchováván v lednici. Před použitím přidáno 65  $\mu$ l Aprotininu (zásobní koncentrace 10 mg.ml<sup>-1</sup>), 100  $\mu$ l PMSF (zásobní koncentrace 17,4 mg.ml<sup>-1</sup>) a 1 tableta cOmplete™ ULTRA Tablets Protease Inhibitor Cocktail.
- **Laemli pufr** – (5× koncentrovaný) – na 50 ml roztoku: 1,89 g TRIS; 5 g SDS; 15 ml glycerolu; 2,5 ml  $\beta$ -merkaptoethanolu a 7,5 mg bromfenolové modři rozpuštěno v destilované vodě; pH 6,8; uchováváno při -20 °C
- **Transfer pufr** (10× koncentrovaný) – na 1 l roztoku: 30,3 g TRIS; 144,9 g glycinu, 5 g SDS rozpuštěno v destilované vodě (používá se 1× koncentrovaný pufr: 100 ml 10× koncentrovaného pufru + 200 ml methanolu + 700 ml destilované vody)
- **TBS-T pufr** – na 1 l roztoku: 30 g TRIS, 5 ml Tween, 2 g KCl, 80 g NaCl rozpuštěno v destilované vodě; pH 7,6 (používá se 10× ředěný roztok)
- **0,5M Tri-HCl pufr** – na 100 ml roztoku: 6,057 g TRIS; 0,298 g EDTA rozpuštěno v destilované vodě; pH 6,8; uchováváno při 4 °C

- **1,5M Tri-HCl pufr** – na 100 ml roztoku: 18,171 g TRIS; 0,298 g EDTA rozpuštěno v destilované vodě; pH 8,8; uchováváno při 4 °C
- **1% želatina** – ředění 40% želatiny v TBS-T, uchováváno při 4 °C

#### 6.4 Příprava aktivátoru a inhibitorů

- **Calcium Ionophore A23187,  $C_{29}H_{37}N_3O_6$**  – rozpuštěn v DMSO na koncentraci 10 mM (zásobní koncentrace) – dále ředěno pomocí HBSS na koncentraci 750  $\mu$ M (výsledná koncentrace ve vzorcích byla 7,5  $\mu$ M)
- **Cl-amidine** (10 $\times$  koncentrovaný) – 5 mg rozpuštěno v 590  $\mu$ l 96% EtOH (20mM roztok), uchováván při -20 °C, dále ředěno pomocí HBSS
- **TDFA** (10 $\times$  koncentrovaný) – 5 mg rozpuštěno v 557  $\mu$ l destilované vody (20mM roztok), uchováván při -20 °C, dále ředěno pomocí HBSS

#### 6.5 Použité přístroje

- Aparatura pro SDS-PAGE a Western blot (BioRad, USA)
- BenchMixer™ Vortex Mixer (Benchmark Scientific, USA)
- Centrifuga 5417R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5804R (Eppendorf, Německo)
- LightCycler® 480 Probes Master (Roche Applied Science, Německo)
- Microplate Washer F109121S 96PW (SLT, Rakousko)
- Mini Spin Plus (Eppendorf, Německo)
- NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Počítač buněk CASY model TT, Cell Counter + Analyser system (Roche Innovatis, Německo)
- Skříňový termostát chlazený ET 619-4 (Lovibond, Německo)
- Spektrofotometr Sunrise (TECAN, Švýcarsko)
- Termoblok Thermo-shaker TS-100C (Biosan, Litva)
- TubeRoller (Benchmark Scientific, USA)
- TurboCycler Lite (Biotech, Taiwan)

## 7 METODY

### 7.1 Izolace neutrofilů z lidské krve

Neutrofilly byly izolovány z krve zdravých dárců podle následujícího postupu:

1. Dárci bylo odebráno 60 ml krve do stříkačky obsahující citrát sodný (na 1 ml krve 100  $\mu$ l citrátu).
2. Následně bylo 20 ml krve opatrně smícháno s 10 ml 3% dextranu v centrifugační zkumavce a ponecháno 40 min při pokojové teplotě pro sedimentaci erytrocytů.
3. Supernatant byl opatrně navrstven na 10 ml Histopaque 1077 tak, aby vzniklo ostré rozhraní mezi oběma roztoky.
4. Směs byla centrifugována s minimální brzdou a akcelerací (390 g, 30 min, pokojová teplota).
5. Supernatant byl vylit a pelet na dně, který obsahoval neutrofilní granulocyty a erytrocyty, byl hemolyzován.
  - a. K peletu bylo přidáno 5 ml vody pro injekce a pelet byl promícháván po dobu 30 s Pasteurovou pipetou.
  - b. Poté bylo přidáno 5 ml 1,8% NaCl pro vyrovnění osmolality a směs byla promíchána.
6. Celkový objem směsi ve zkumavce byl doplněn pomocí PBS na 40 ml.
7. Směs byla centrifugována s brzdou a akcelerací na maximum (190 g, 10 min, pokojová teplota).
8. Supernatant byl odstraněn a k buňkám byl přidán 1 ml HBSS pufru.
9. Byla změřena koncentrace a viabilita neutrofilních granulocytů (CASY) a poté byly tyto buňky naředěny na koncentraci  $3 \cdot 10^6$  buněk. $\text{ml}^{-1}$ .

Všechny centrifugační kroky byly provedeny s využitím centrifugy Centrifuge 5804R, Eppendorf.

### 7.2 Příprava vzorků pro stanovení exprese cytokinů a míry citrulinace

Vyizolované buňky neutrofilních granulocytů byly rozsuspendovány v HBSS pufru a naředěny na koncentraci  $3 \cdot 10^6$  buněk. $\text{ml}^{-1}$ . Tyto buňky byly následně použity pro přípravu vzorků pro detekci citrulinace histonu H3 pomocí Western blotu, stanovení genové exprese vybraných cytokinů metodou ELISA a pro izolaci mRNA. Postup přípravy vzorků uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Postup přípravy vzorků pro Western blot, ELISU a izolaci mRNA

Vzorek	Buňky	HBSS	2 mM Cl-amidine	2 mM TDFA	CaI
1	1780 μl	200 μl	-	-	20 μl
2		150 μl	50 μl	-	20 μl
3		150 μl	-	50 μl	20 μl
4		220 μl	-	-	-
1	1780 μl	200 μl	-	-	20 μl
2		100 μl	100 μl	-	20 μl
3		100 μl	-	100 μl	20 μl
4		220 μl	-	-	-

1. Nejprve byl k buňkám přidán pufr HBSS a v případě druhého a třetího vzorku i jeden z inhibitorů. Byly použity dvě různé koncentrace inhibitorů – 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Tato směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 min.
2. Následně byl do vzorku přidán CaI (výsledná koncentrace 7,5  $\mu$ M) a směs byla inkubována opět při teplotě 37 °C po dobu 30 min.
3. Po skončení inkubace byly buňky centrifugovány (300 g, 5 min, 4 °C).
4. Ze zkumavek byly odebrány supernatanty, které byly následně uchovávány při teplotě -80 °C.
5. Pelety byly promyty 1 ml PBS a vzorky byly použity pro izolaci mRNA a pro stanovení citrulinace pomocí western blotu.

### 7.3 Detekce citrulinace histone H3 pomocí western blotu

#### 7.3.1 Příprava vzorků pro western blot

1. K peletům bylo po odsátí PBS přidáno 200  $\mu$ l IP pufru pro lyzování buněk.
2. Buňky byly sonikovány po dobu 5 s a poté centrifugovány (16000 g, 5 min, 4 °C).
3. Byl odebrán supernatant a byla změřena koncentrace proteinů (kapitola 8.5) Vzorky byly naředěny na koncentraci proteinů 600 mg.ml<sup>-1</sup>.
4. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

### 7.3.2 Příprava gelů pro western blot

Byly připraveny dva 15% rozdělovací polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm a 15 jamkové hřebínkové gely. Jeden gel byl použit pro detekci citrulinace histonu H3 a druhý gel pro stanovení  $\beta$ -aktinu. Postup přípravy gelů uvádí Tabulka 2. V tabulce jsou uvedeny objemy pro přípravu dvou gelů.

Tabulka 2: Příprava gelů pro western blot

	15% rozdělovací gel	Hřebínkový gel
H <sub>2</sub> O	3,5 ml	5 ml
1,5 M TRIS (pH 8,8)	3,8 ml	-
0,5 M TRIS (pH 6,8)	-	2,1 ml
30% akrylamid	7,5 ml	1,5 ml
10% SDS	0,9 ml	0,7 ml
TEMED	45 $\mu$ l	45 $\mu$ l
10% APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Nejprve byl napipetován 15% rozdělovací gel, který byl poté převrstven 200  $\mu$ l izopropanolu a ponechán 30 min při pokojové teplotě. Po zpolymerizování a ztuhnutí gelu byl izopropanol odmyt pomocí destilované vody a jeho zbytky odsáty filtračním papírem. Poté byl napipetován hřebínkový gel a po jeho ztuhnutí byly gely vloženy do použitého elektroforetického pufru a ponechány přes noc při teplotě 4 °C.

### 7.3.3 Elektroforéza

1. Ke vzorkům lyzovaných buněk byl přidán Laemli pufr v poměru objemů pufru a vzorku 1:4.
2. Vzorky byly zvortexovány a povařeny po dobu 5 min při 100 °C v termobloku.
3. Po sestavení aparatury bylo do každé jamky napipetováno 17  $\mu$ l zvortexovaného vzorku a do jedné jamky byl napipetován marker (Thermo Fisher Scientific, USA).
4. Každý vzorek byl napipetován do 2 gelů – jeden pro detekci  $\beta$ -aktinu a druhý pro detekci citrulinovaného histonu H3.
5. Byl dolit elektroforetický pufr a elektroforéza byla nejprve spuštěna při 90 V po dobu 15 min a poté při 120 V přibližně 90 min.



#### 7.3.4 Western blot

1. Byl proveden přenos proteinů z gelu na PVDF (polyvinylidene difluoride) membránu, která byla nejprve aktivována v methanolu.
2. Aparatura byla vložena do nádoby obsahující led nebo ledové bločky a zalita čerstvým transfer pufrem.
3. Přenos na membránu probíhal 2,5 h při 230 mA.
4. Membrány byly blokovány 1 h při pokojové teplotě v roztoku 1% želatiny (citrulinovaný H3) nebo v 5% roztoku mléka ( $\beta$ -aktin).
5. Membrány byly třikrát promývány v roztoku TBS-T vždy po dobu 10 min.

#### 7.3.5 Imunodetekce proteinů

1. Membrány byly vloženy do primárních protilátek a inkubovány přes noc na rolleru při 4 °C:
  - Citrulinovaný histon H3: králičí anti-histone H3 (Citrulline) protilátka (Abcam 5103) – ředěna 1:500 v 1% želatině
  - $\beta$ -aktin: myší anti –  $\beta$ -aktin protilátka (A 5441) – ředěna 1:5000 v 5% mléku
2. Membrány byly třikrát promývány v roztoku TBS-T vždy po dobu 10 min.
3. Membrány byly vloženy do sekundárních protilátek a inkubovány 1 h na rolleru při pokojové teplotě:
  - Citrulinovaný histon H3: Anti-rabbit IgG značená křenovou peroxidasou – ředěna 1:3000 v 1% roztoku želatiny
  - $\beta$ -aktin: Anti-mouse IgG značená křenovou peroxidasou – ředěna 1:2000 v 5% mléku
4. Membrány byly třikrát promývány v roztoku TBS-T vždy po dobu 10 min.
5. Pro detekci křenové peroxidasy byl použit chemiluminiscenční substrát a signál byl zaznamenán na radiografické filmy.
6. Po naskenování filmů byla vyhodnocena optická denzita (OD) v programu ImageJ.

#### 7.4 Stanovení exprese cytokinů pomocí qPCR

Pro stanovení cytokinů pomocí qPCR byla nejprve izolována mRNA z buněk neutrofilních granulocytů. Tato mRNA byla následně reverzní transkripcí přepsána do cDNA, která byla použita při PCR reakci.

#### 7.4.1 Izolace mRNA z neutrofilů

Izolace mRNA z neutrofilů byla provedena pomocí kitu CatchGene® Cell/Tissue RNA Kit podle návodu výrobce. Koncentrace vyizolované mRNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 1000 a mRNA byla poté uchovávána při teplotě -80 °C.

#### 7.4.2 Příprava cDNA pro Real-time PCR

Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Všechny kroky tohoto procesu probíhaly na ledu a ve sterilním prostředí.

1. Nejprve byla připravena reakční směs obsahující RNA a primery (Tabulka 3).

Tabulka 3: Příprava směsi obsahující RNA a primery pro reverzní transkripci

Reagent	Objem (μl)	Výsledná koncentrace
RNA		1 μg
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1	2,5 μM
Random Hexamer Primer	2	60 μM
H <sub>2</sub> O (PCR grade)	do 13 μl	-

2. Směs byla denaturována při teplotě 65 °C po dobu 10 min v termocykleru (TurboCycler Lite, Biotech) pro odstranění sekundárních struktur RNA. Po denaturaci byla směs okamžitě ochlazená.
3. Do směsi byly následně přidány další komponenty (Tabulka 4) a směs byla promíchána pipetou a krátce centrifugována.

Tabulka 4: Kompletní směs pro reverzní transkripci

Reagent	Objem (μl)	Výsledná koncentrace
Transcriptor reverse Transcriptase Reaction Buffer (5× konc.)	4	1×
Protector Rnase Inhibitor (40 U/ μl)	0,5	20 U
Deoxynucleotide Mix (10 mM)	2	1 mM
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μl)	0,5	10 U

4. Reverzní transkripce probíhala ve třech krocích, kdy směs byla inkubována v termocykleru při následujících teplotách:
  - a. 10 min při 25 °C
  - b. 60 min při 50 °C
  - c. 5 min při 85 °C (inaktivace reverzní transkriptasy)
5. Reakce byla zastavena umístěním zkumavek na led a cDNA byla uložena do -20 °C.

#### 7.4.3 Stanovení genové exprese IL-8 a TNF $\alpha$ pomocí Real-time PCR

Všechny kroky přípravy vzorků pro Real-time PCR byly prováděny na ledu a ve sterilním prostředí. Všechny vzorky byly připravovány v duplikátech.

Pro stanovení genové exprese cytokinů byly využity kity TaqMan® Gene Expression Assays obsahující sondu a primery pro daný gen (*cxcl8*, *tnfa*). Jako referenční gen byl použit gen *actb*.

1. Vzorky cDNA byly 5× naředěny v DEPC vodě (v poměru 1:4).
2. Byla připravena reakční směs pro referenční gen (Tabulka 5).

Tabulka 5: Příprava reakční směsi pro referenční gen

Reagent	Výsledná koncentrace	Objem (μl)
Probes master 2×	1×	5
Forward + Reverse primer	0,5 μM	0,5+0,5
UPL probe (10 μM)	0,2 μM	0,1
H <sub>2</sub> O	-	1,9
cDNA	-	2

3. Následně byla připravena reakční směs pro námi zkoumaný gen (Tabulka 6).

Tabulka 6: Příprava reakční směsi pro zkoumaný gen

Reagent	Výsledná koncentrace	Objem (μl)
Probes master 2×	1×	5
20× TaqMan® Gene Expression Assay	1×	0,5
cDNA	-	2
H <sub>2</sub> O	-	2,5

4. Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 10  $\mu$ l příslušné reakční směsi a destička byla zakryta fólií.
5. Destička byla zvortexována, krátce stočena a vložena do termocykleru (LightCycler® 480 Probes Master).
6. Reakce probíhala za následujících podmínek, které uvádí Tabulka 7.

Tabulka 7: Podmínky Real-time PCR

	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)
Pre-inkubace	1	95	00:10:00
Amplifikace	45	95	00:00:10
		60	00:00:30
		72	00:00:01
Chlazení	1	40	00:01:00

## 7.5 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovována u lyzovaných buněk, které byly následně použity pro stanovení exprese cytokinů pomocí metody ELISA a pro stanovení citrulinace histonu H3 metodou western blot.

1. Byla připravena kalibrační řada z roztoku BSA v IP pufru o koncentracích 4; 2; 1; 0,5; 0,25 a 0,125  $\text{mg.ml}^{-1}$ .
2. Do 96-jamkové destičky bylo napipetováno 10  $\mu$ l kalibračních roztoků v duplikátech.
3. Do destičky byly poté napipetováno 10  $\mu$ l vzorků, které byly připraveny lyzováním buněk neutrofilních granulocytů.
4. Ke všem vzorkům bylo přidáno 200  $\mu$ l směsi BCA (ředěno v poměru 50:1).
5. Deska byla zakryta alobalem a 30 min inkubována při teplotě 37 °C.
6. Následně byla deska ponechána 10 min při pokojové teplotě.
7. Koncentrace proteinů byla změřena pomocí přístroje Spektrofotometr Sunrise při vlnové délce 562 nm.
8. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka a vypočteny koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

Pro obě metody byly vzorky naředěny na koncentraci proteinů 600  $\text{mg.ml}^{-1}$  pomocí IP pufru.

## **7.6 Stanovení exprese vybraných cytokinů metodou ELISA**

Pro stanovení koncentrace cytokinů na úrovni proteinů byly použity ELISA kity pro IL-8, TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Stanovení bylo provedeno podle návodů výrobce a koncentrace proteinů byla změřena pomocí přístroje Spektrofotometr Sunrise.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

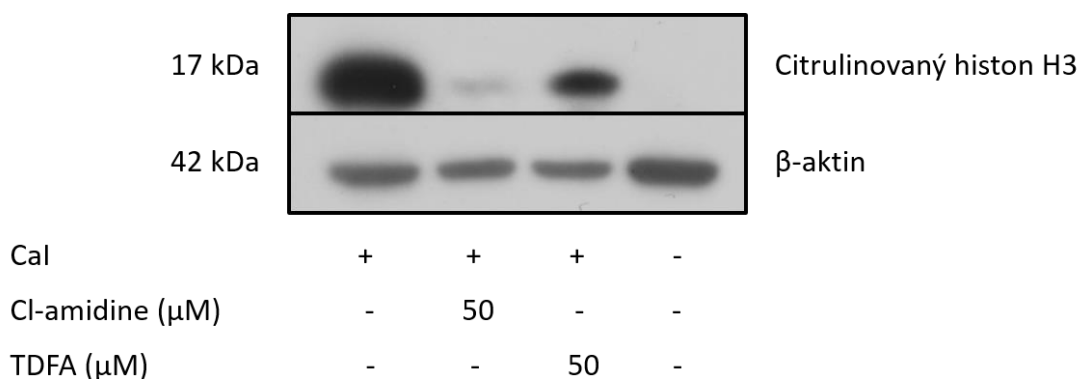
### 8.1 Stanovení míry citrulinace histonu H3 pomocí western blotu

Pro stanovení míry citrulinace byly vybrány buňky neutrofilních granulocytů, které jsou důležitými buňkami vrozené imunity. Jsou prvními leukocyty, které se dostávají do místa infekce nebo zánětu, kde jsou schopny eliminovat patogeny pomocí několika různých mechanismů, mezi které patří fagocytóza, degranulace, tvorba ROS a NETóza [1], [2], [3].

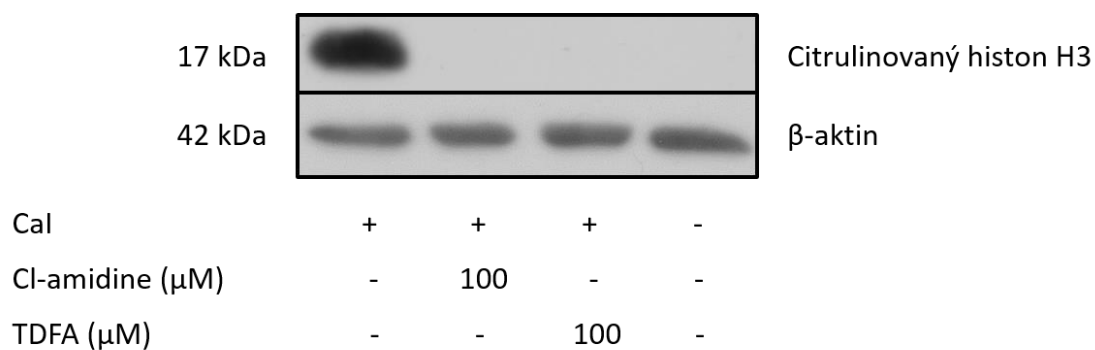
Při procesu NETózy je do extracelulárního prostředí uvolňována zejména jaderná DNA a citrulinované histonové proteiny [41]. Citrulinace histonových proteinů je katalyzována enzymem PAD4, který je exprimován v jádře buněk a touto PTM histonových proteinů způsobuje oslabení vazby mezi DNA a histonovými proteiny, což vede k dekondenzaci chromatinu a tvorbě NETs [78], [3].

V této práci byly použity dva různé inhibitory PAD4 – Cl-amidine a TDFA. Cl-amidine je inhibitor všech PAD izoenzymů, které inhibuje alkylací cysteinu C645 [92]. Ze struktury tohoto inhibitoru byla odvozena struktura druhého použitého inhibitoru – TDFA, který je vysoce selektivním ireverzibilním inhibitor PAD4 [93].

Pomocí metody western blot byla stanovena míra citrulinace histonu H3 a  $\beta$ -aktin. Pro navození citrulinace byl použit vápníkový ionofor (CaI), který aktivuje PAD enzymy. Byly testovány dvě koncentrace Cl-amidinu a TDFA (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M). Ze získaných snímků je zřejmá závislost míry citrulinace na použitém inhibitoru a jeho koncentraci (Obrázek 9, Obrázek 10).

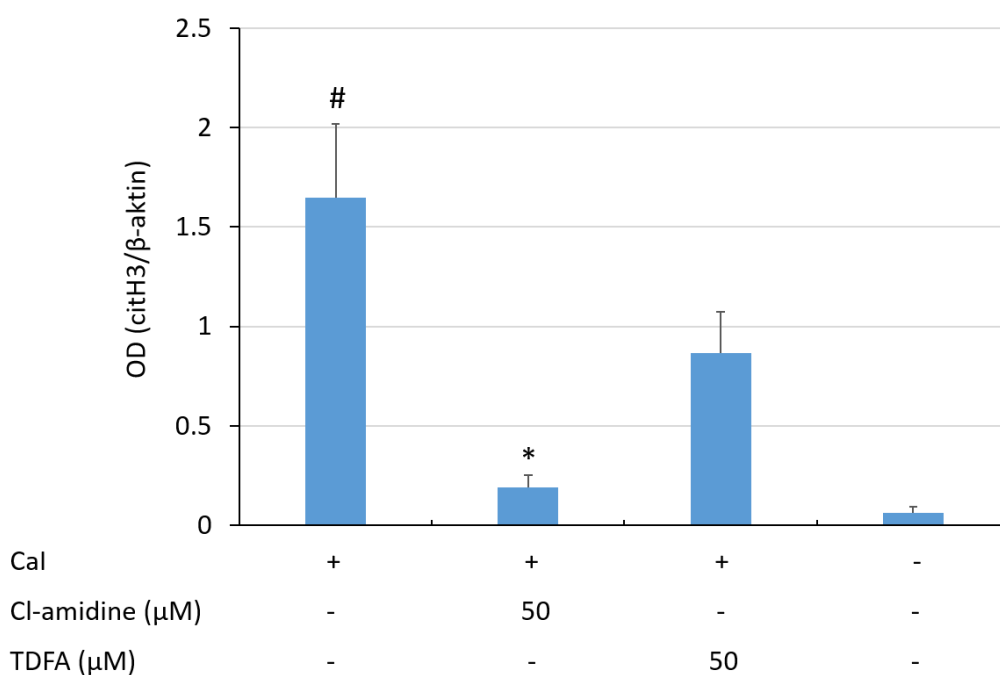


Obrázek 9: Stanovení míry citrulinace histonu H3 za použití Cl-amidinu a TDFA o koncentraci 50  $\mu$ M. V případě pozitivní kontroly byl k buňkám neutrofilních granulocytů přidán pouze CaI. Další dva vzorky obsahovaly CaI a jeden z použitých inhibitorů o koncentraci 50  $\mu$ M. Reprezentativní snímek.



Obrázek 10: Stanovení míry citrulinace histonu H3 za použití Cl-amidinu a TDFA o koncentraci 100 μM. V případě pozitivní kontroly byl k buňkám neutrofilních granulocytů přidán pouze CaI. Další dva vzorky obsahovaly CaI a jeden z použitých inhibitorů o koncentraci 100 μM. Reprezentativní snímek.

Ze snímků získaných western blotem byla vyhodnocena OD v programu ImageJ. OD citrulinovaného histonu H3 byla vyhodnocena oproti OD β-aktinu. Vyhodnocení míry citrulinace histonu H3 při použití inhibitorů o koncentraci 50 μM je zobrazeno na Obrázek 11.

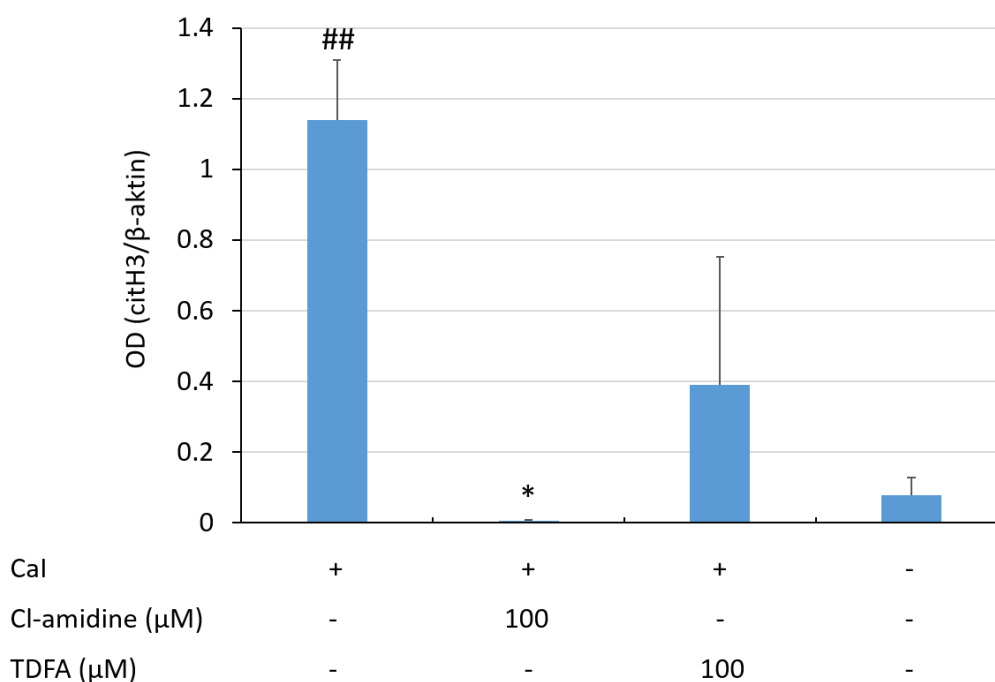


Obrázek 11: Vyhodnocení míry citrulinace za využití 50 μM Cl-amidinu a TDFA. Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM, \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Z grafu je patrné, že po aktivaci PAD4 pomocí CaI byla významně zvýšena míra citrulinace histonu H3 oproti negativní kontrole. Ve vzorcích, kde byl pro inhibici PAD4 použit 50 μM

Cl-amidine, docházelo k významnému snížení míry citrulinace histonu H3. Při použití TDFA o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , byla míra citrulinace oproti pozitivní kontrole rovněž snížena, ale toto snížení nebylo statisticky významné.

Dále byla vyhodnocována míra citrulinace histonu H3 za použití inhibitorů o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Tyto výsledky zobrazuje Obrázek 12.



Obrázek 12: Stanovení míry citrulinace za využití 100  $\mu\text{M}$  Cl-amidinu a TDFA. Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ;  $n = 3$ .

Po navození citrulinace přidáním CaI docházelo k velmi významnému zvýšení míry citrulinace histonu H3 oproti negativní kontrole. Při použití 100  $\mu\text{M}$  Cl-amidinu k citrulinaci histonu H3 téměř nedocházelo. Ve vzorcích, kde byl přidán 100  $\mu\text{M}$  TDFA byla míra citrulinace snížena, ale toto snížení nebylo statisticky významné.

Cl-amidine více ovlivňoval míru citrulinace při obou použitých koncentracích inhibitorů. TDFA rovněž míru citrulinace snižoval, ale v obou případech bez statistické významnosti.

Tyto výsledky se shodují s výsledky dalších výzkumných skupin. Biron a jeho kolegové rovněž zkoumali vliv Cl-amidinu na míru citrulinace histonu H3 a tvorbu NETs u myši, u nichž byla navozena sepse metodou cekální ligace a punkce (CLP). Citrulinace histonu H3 byla



rovněž detekována pomocí metody western blot za využití primární protilátky proti citrulinovanému histonu H3 – anti-Histone H3 (citrulline R2+R8+R17) (ab5103). Přítomnost citrulinovaného histonu H3 byla vyhodnocena deztometricky a normalizována na  $\beta$ -aktin. Po 24 h byla přítomnost citrulinovaného histonu H3 v peritoneálních buňkách výrazně zvýšena. Při přidání Cl-amidinu docházelo k výraznému snížení míry citrulinace histonu H3 v peritoneálních buňkách [106].

Colón a jeho kolegové při zkoumání role NETs při sepsi navozené pomocí LPS u myši také použili Cl-amidinu jako inhibitor PAD4. Tento inhibitor byl přidán 1 h před navozením sepse. LPS značně zvyšovalo míru citrulinace histonu H3 a expresi genu *PAD4* u těchto myši. Použití Cl-amidinu značně snižovalo míru mortality myši, u nichž byla navozena sepe [107].

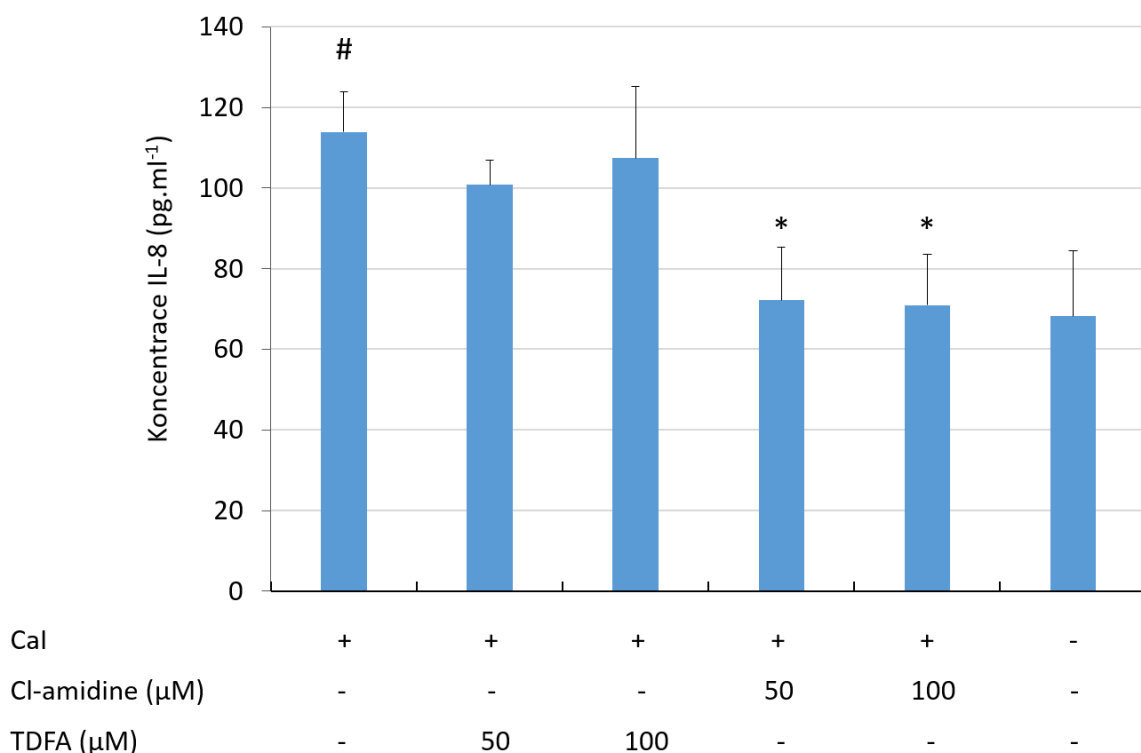
Fuhrmann a Thompson rovněž stanovovali míru citrulinace histonového proteinu H3 v buňkách lidských neutrofilních granulocytů za využití ireverzibilních inhibitorů Cl-amidinu a TDFA a následné aktivace enzymu PAD4 vápníkovým ionoforem. Míra citrulinace histonu H3 byla stanovována metodou western blot s využitím protilátky anti-Histone H3 (citrulline R2+R8+R17).  $IC_{50}$  pro Cl-amidinu byla stanovena na 5  $\mu$ M a pro TDFA na 2,3  $\mu$ M [108]. Z našich výsledků je ale patrné, že k významnější inhibici docházelo při použití Cl-amidinu, a to až při vyšších koncentracích.

## **8.2 Stanovení genové exprese vybraných cytokinů**

Citrulinace histonových proteinů může vést ke změnám exprese řady genů [76]. Jednou ze skupin genů, jejichž exprese může být touto PTM ovlivněna, jsou geny pro cytokiny. Tyto proteiny regulují řadu fyziologických dějů, mezi které patří například pohyb imunitních buněk do místa infekce nebo zánětu, ale mohou se rovněž podílet na destruktivních a zánětlivých procesech v průběhu různých onemocnění. Mezi tato onemocnění patří například revmatoidní artritida [55].

### **8.2.1 IL-8**

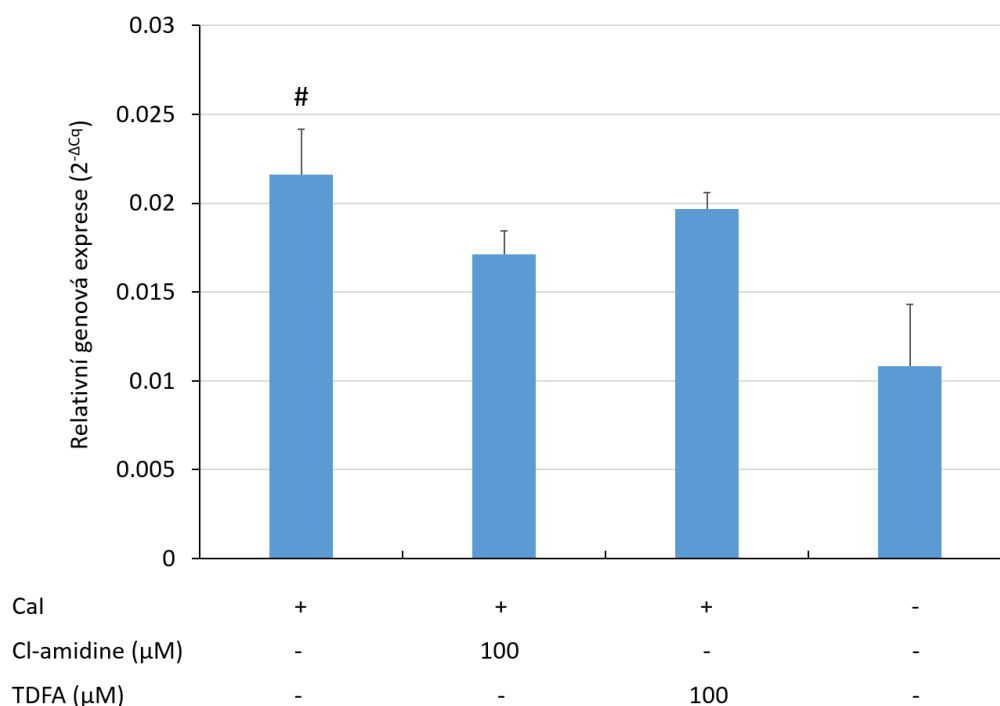
Metodou ELISA byly stanoveny koncentrace IL-8 v buněčných lyzátech neutrofilních granulocytů po aktivaci PAD4 pomocí CaI. Pro inhibici byly použity inhibitory TDFA a Cl-amidinu o koncentracích 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Výsledky zobrazuje Obrázek 13.



Obrázek 13: Stanovení koncentrace IL-8 v buněčných lyzátech neutrofilních granulocytů. Pro inhibici byly použity inhibitory TDFA a Cl-amidine o koncentracích 50 a 100 μM. Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM, \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Po aktivaci došlo k významnému zvýšení produkce IL-8 oproti negativní kontrole. Při použití nespecifického PAD inhibitoru Cl-amidinu došlo k významnému snížení produkce IL-8 při obou jeho použitých koncentracích. V případě inhibitoru TDFA, který je specifický pouze pro PAD4, došlo též ke snížení produkce IL-8, ale tento rozdíl byl statisticky nevýznamný.

Výsledky získané pomocí metody ELISA byly potvrzeny i na úrovni mRNA za využití kvantitativní PCR. Vzorky byly připraveny stejným způsobem, jako pro stanovování metodou ELISA a poté byla z buněk neutrofilních granulocytů vyizolována mRNA, která byla přepsána do cDNA a využita při kvantitativní PCR. Tyto výsledky zobrazuje Obrázek 14.

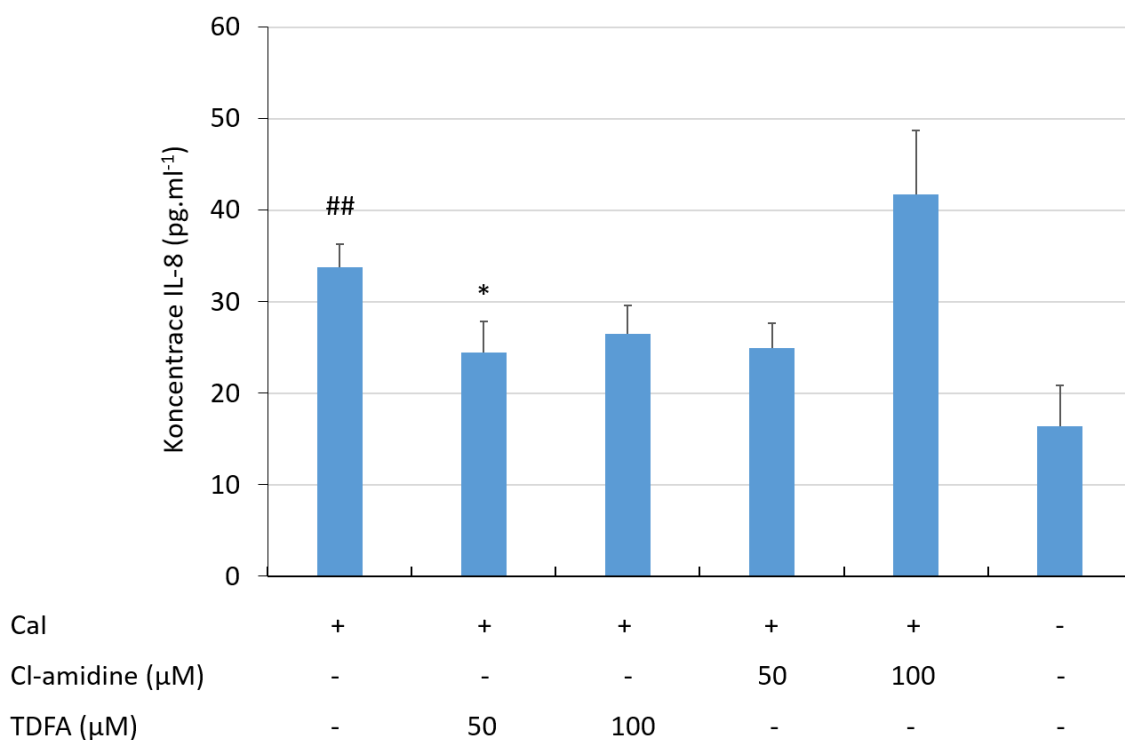


Obrázek 14: Stanovení genové exprese IL-8 v buňkách neutrofilních granulocytů. Pro inhibici PAD4 byly použity inhibitory TDFA a CI-amidine o koncentraci 100 μM. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM, #  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ .

Po aktivaci PAD4 pomocí Cal došlo k významnému zvýšení genové exprese IL-8 oproti negativní kontrole. Použité inhibitory o koncentraci 100 μM snížily genovou expresi IL-8, ale toto snížení bylo statisticky nevýznamné.

Jako referenční gen při stanovení genové exprese byl použit *ACTB*. Tento gen byl navržen jako vhodný referenční gen pro buňky neutrofilních granulocytů, díky jeho stabilní a vysoké hladině exprese v těchto buňkách [109].

Kromě zvýšené produkce IL-8 buňkami neutrofilních granulocytů, docházelo rovněž ke zvýšenému uvolňování IL-8 do extracelulárního prostředí. Výsledky získané pomocí ELISY znázorňuje Obrázek 15.



Obrázek 15: Stanovení koncentrace IL-8 v supernatantech neutrofilních granulocytů. Pro inhibici byly použity inhibitory TDFA a Cl-amidine o koncentracích 50 a 100 μM. Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM, \* $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ;  $n = 4$ .

Po aktivaci pomocí CaI docházelo k velice významnému zvýšení koncentrace IL-8 v supernatantech neutrofilních granulocytů oproti negativní kontrole. K významnému snížení koncentrace IL-8 v supernatantu docházelo pouze v případě použití inhibitoru TDFA o koncentraci 50 μM. Při inhibici 100 μM TDFA a 50 μM Cl-amidinem rovněž docházelo ke snížení míry degranulace, ale tento pokles nebyl statisticky významný.

Zvýšená produkce IL-8 v závislosti na míře citrulinace byla potvrzena i při experimentech dalších výzkumných skupin. Míra citrulinace histonu H3 pozitivně korelovala s koncentrací IL-8 v plazmě pacientů v pokročilém stádiu rakoviny [110].

### 8.2.2 TNFα

Dalším cytokinem, jehož genová exprese a produkce buňkami neutrofilních granulocytů byla stanovována, byl TNFα. Pro aktivaci PAD4 a navození citrulinace byl použit CaI a rovněž byly testovány inhibitory Cl-amidine a TDFA o koncentracích 50 a 100 μM.

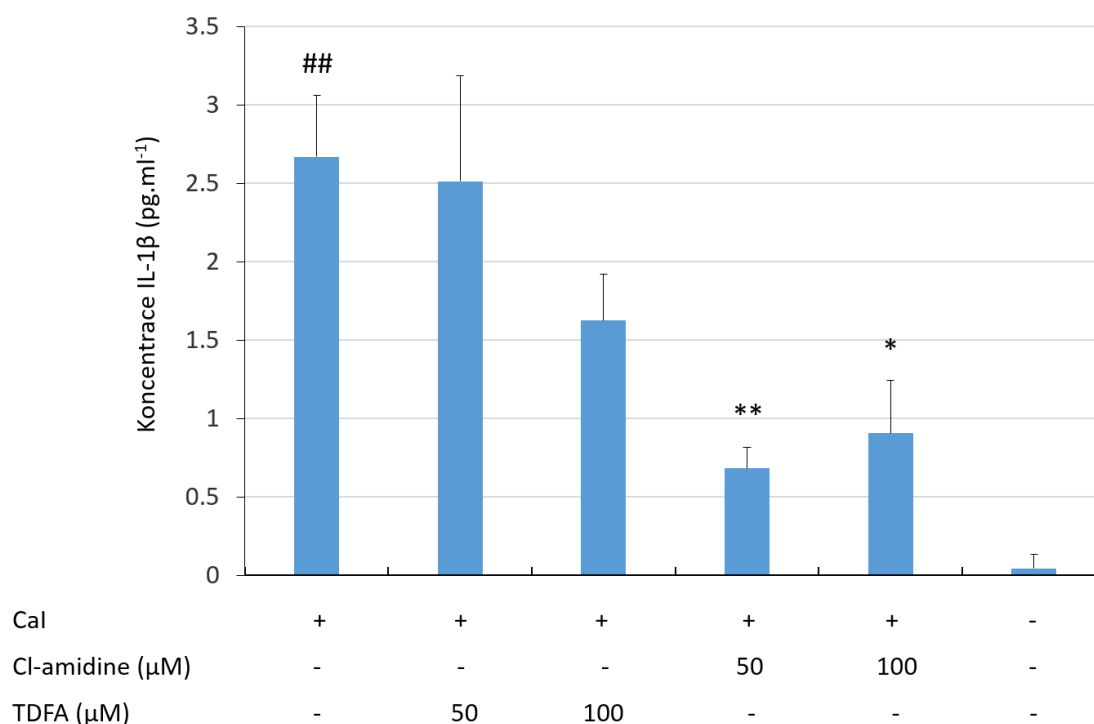
Produkce  $\text{TNF}\alpha$  byla stanovována metodou ELISA a pomocí kvantitativní PCR, avšak exprese tohoto cytokinu se nepodařila prokázat na úrovni proteinů, ani na úrovni mRNA.

Thålin a jeho kolegové zkoumali závislost produkce  $\text{TNF}\alpha$  na míře citrulinace histonu H3 v plazmě pacientů v pokročilém stádiu rakoviny a potvrdily pouze slabou korelaci mezi mírou citrulinace histonu H3 a koncentrací  $\text{TNF}\alpha$  [110]

Na rozdíl od námi získaných výsledků, bylo dále zjištěno, že zvýšená míra citrulinace a exprese genu *PAD4* navozená pomocí LPS u myši vedla ke zvýšení koncentrace  $\text{TNF}\alpha$  v séru i v supernatantech. Tato data byla získána pomocí metody ELISA [107].

### 8.2.3 IL-1 $\beta$

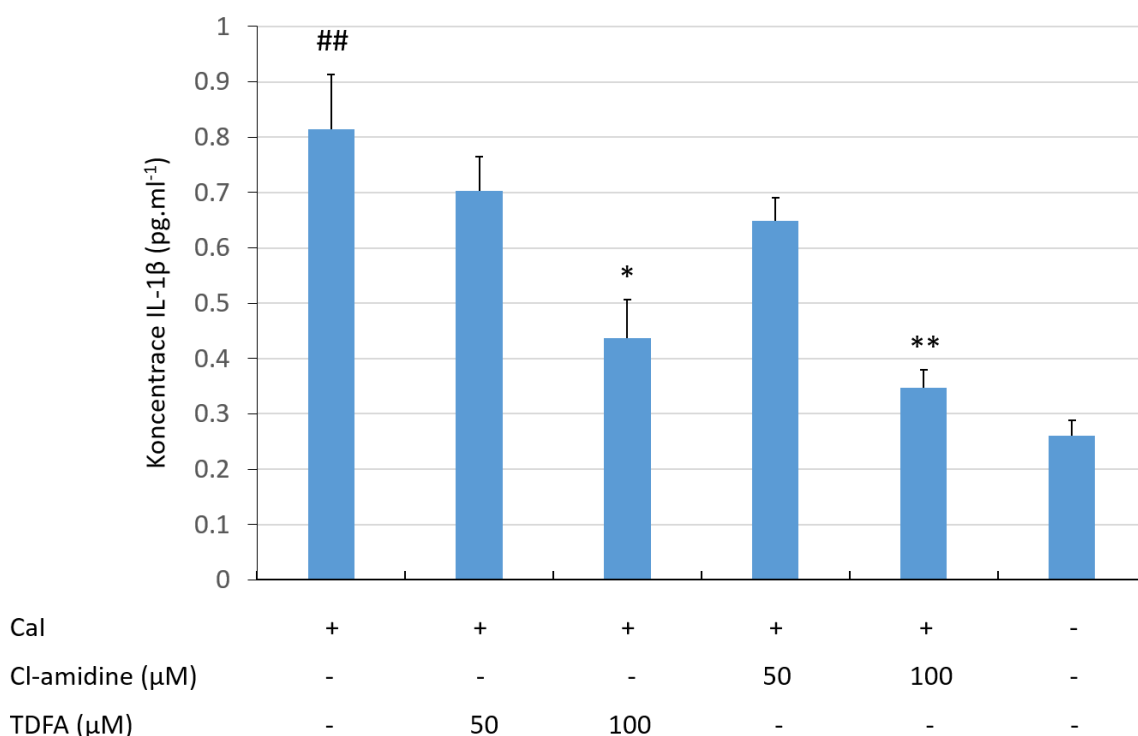
Posledním cytokinem, jehož produkce buňkami neutrofilů byla stanovována je IL-1 $\beta$ . Nejprve byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech neutrofilních granulocytů. Výsledky zobrazuje Obrázek 16.



Obrázek 16: Stanovení koncentrace IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech neutrofilních granulocytů. Pro inhibici byly použity inhibitory TDFA a Cl-amidine o koncentracích 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ## $p < 0,01$ ;  $n = 4$ .

Aktivace pomocí CaI vedla k velmi významnému zvýšení koncentrace IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech oproti negativní kontrole. Při inhibici PAD4 pomocí Cl-amidinu docházelo k významnému snížení koncentrace cytokinu IL-1 $\beta$  při obou použitých koncentracích inhibitoru. Inhibice pomocí TDFA vedla ke snížení koncentrace IL-1 $\beta$ , avšak toto snížení nebylo statisticky významné.

Dále byla stanovována koncentrace IL-1 $\beta$  v supernatantech neutrofilních granulocytů metodou ELISA. Výsledky zobrazuje Obrázek 17.



Obrázek 17: Stanovení koncentrace IL-1 $\beta$  v supernatantech neutrofilních granulocytů. Pro inhibici byly použity inhibitory TDFA a Cl-amidinu o koncentracích 50 a 100  $\mu$ M. Statisticky významné rozdíly mezi aktivovanou kontrolou a vzorky obsahujícími inhibitory jsou zobrazeny jako \*. Statisticky významné rozdíly mezi negativní a aktivovanou kontrolou jsou zobrazeny jako #. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ## $p < 0,01$ ;  $n = 6$ .

Po aktivaci PAD4 pomocí CaI docházelo k velmi významnému zvýšení koncentrace IL-1 $\beta$  uvolněného do extracelulárního prostředí oproti negativní kontrole. Ve vzorcích, kde byly pro inhibici použity inhibitory o koncentraci 100  $\mu$ M, můžeme pozorovat významné snížení koncentrace IL-1 $\beta$  v supernatantech. V případě inhibice oběma 50  $\mu$ M inhibitory byla koncentrace uvolněného IL-1 $\beta$  rovněž snížena, ale toto snížení nebylo statisticky významné.

Tyto výsledky byly potvrzeny i experimenty provedenými v dalších výzkumných skupinách. Při zkoumání role NETs při sepsi navozené pomocí LPS u myší, LPS značně zvyšovalo míru citrulinace histonu H3 a expresi genu *PAD4* u těchto myší. Rovněž byla potvrzena zvýšená koncentrace cytokinu IL-1 $\beta$  v séru myší, u kterých došlo k navození sepse oproti negativní kontrole. Toto stanovení proběhlo také pomocí metody ELISA [107].

## 9 ZÁVĚR

V úvodu této diplomové práce byla zpracována literární rešerše. V teoretické části byl popsán význam neutrofilních granulocytů ve vrozené imunitě a mechanismy, které tyto buňky využívají při boji s patogeny. Poté byla popsána funkce cytokinů regulujících tyto buňky, mechanismus citrulinace a význam histonových proteinů.

V praktické části byla stanovována koncentrace prozánětlivých cytokinů (IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) v závislosti na míře citrulinace histonu H3. Pro aktivaci PAD4, která katalyzuje citrulinaci histonových proteinů, byl použit CaI a pro inhibici tohoto enzymu sloužily dva inhibitory: Cl-amidine inhibující všechny PAD enzymy a TDFA, který je specifickým inhibitorem PAD4.

Bylo zjištěno, že po aktivaci PAD4 pomocí CaI docházelo k významnému zvýšení produkce IL-8 a IL-1 $\beta$ . Zvýšení exprese IL-8 bylo rovněž potvrzeno i na úrovni mRNA pomocí qPCR. K inhibici PAD4 a snížení produkce IL-8 a IL-1 $\beta$  docházelo za použití obou inhibitorů, což dokazuje vliv citrulinace na produkci těchto cytokinů.

Expresi TNF $\alpha$  se nepodařilo prokázat ani na úrovni proteinů pomocí metody ELISA, ani na úrovni mRNA.

Pozorovaný vliv citrulinace na produkci těchto prozánětlivých cytokinů není pravděpodobně závislý pouze na enzymu PAD4, ale i na aktivitě dalších PAD enzymů, jelikož dochází k různé inhibici pomocí Cl-amidinu a TDFA, který je specifický pouze pro PAD4.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* [online]. 2010, **33**(5), 657–670. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
- [2] NATHAN, Carl. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2006, **6**(3), 173–182. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri1785
- [3] BRINKMANN, Volker, Ulrike REICHARD, Christian GOOSMANN, Beatrix FAULER, Yvonne UHLEMANN, David S. WEISS, Yvette WEINRAUCH a Arturo ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2004, **303**(5663), 1532–1535. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1092385
- [4] MESTAS, Javier a Christopher C. W. HUGHES. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2004, **172**(5), 2731–2738. ISSN 0022-1767.
- [5] PILLAY, Janesh, Ineke DEN BRABER, Nienke VRISEKOOP, Lydia M. KWAST, Rob J. DE BOER, José A. M. BORGHANS, Kiki TESSELAAR a Leo KOENDERMAN. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* [online]. 2010, **116**(4), 625–627. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-01-259028
- [6] AL, Winkler IG, et. *Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside ...* - PubMed - NCBI [online]. [vid. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393133>
- [7] KRUGER, Philipp, Mona SAFFARZADEH, Alexander N. R. WEBER, Nikolaus RIEBER, Markus RADSACK, Horst von BERNUTH, Charaf BENARAF, Dirk ROOS, Julia SKOKOWA a Dominik HARTL. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathogens* [online]. 2015, **11**(3), e1004651. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004651
- [8] LAPIDOT, T. a O. KOLLET. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* [online]. 2002, **16**(10), 1992–2003. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2402684
- [9] BACHELERIE, Françoise, Adit BEN-BARUCH, Amanda M. BURKHARDT, Christophe COMBADIÈRE, Joshua M. FARBER, Gerard J. GRAHAM, Richard HORUK, Alexander Hovard SPARRE-ULRICH, Massimo LOCATI, Andrew D. LUSTER, Alberto MANTOVANI, Kouji MATSUSHIMA, Philip M. MURPHY, Robert NIBBS, Hisayuki NOMIYAMA, Christine A. POWER, Amanda E. I. PROUDFOOT, Mette M. ROSENKILDE, Antal ROT, Silvano SOZZANI, Marcus THELEN, Osamu YOSHIE a Albert ZLOTNIK. International union of pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological Reviews* [online]. 2014, **66**(1), 1–79. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.113.007724
- [10] LEY, Klaus, Carlo LAUDANNA, Myron I. CYBULSKY a Sussan NOURSHARGH. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2007, **7**(9), 678–689. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri2156

- [11] SHAW, Sunil K., Shuo MA, Michael B. KIM, Ravi M. RAO, Charles U. HARTMAN, Richard M. FROIO, Lin YANG, Todd JONES, Yuan LIU, Asma NUSRAT, Charles A. PARKOS a F. William LUSCINSKAS. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **200**(12), 1571–1580. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20040965
- [12] ZAPPONI, Kiara C. S., Fernanda A. ORSI, Luis F. BITTAR, Aline BARNABÉ, Bruna M. MAZETTO, Fernanda D. SANTIAGO-BASSORA, Mariane C. FLORES-NASCIMENTO, Erich V. DE PAULA a Joyce M. ANNICHINO-BIZZACCHI. Adhesive Properties of Neutrophils as a Possible Biomarker of Vascular Disease. In: Vinood B. PATEL a Victor R. PREEDY, ed. *Biomarkers in Cardiovascular Disease* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015 [vid. 2019-04-26], s. 1–19. ISBN 978-94-007-7741-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7741-5\_24-1
- [13] PHILLIPSON, Mia a Paul KUBES. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine* [online]. 2011, **17**(11), 1381–1390. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.2514
- [14] SADIK, Christian D., Nancy D. KIM a Andrew D. LUSTER. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology* [online]. 2011, **32**(10), 452–460. ISSN 1471-4981. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2011.06.008
- [15] SUMMERS, Charlotte, Sara M. RANKIN, Alison M. CONDLIFFE, Nanak SINGH, A. Michael PETERS a Edwin R. CHILVERS. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* [online]. 2010, **31**(8), 318–324. ISSN 1471-4981. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2010.05.006
- [16] GUTHRIE, L. A., L. C. MCPHAIL, P. M. HENSON a R. B. JOHNSTON. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*. 1984, **160**(6), 1656–1671. ISSN 0022-1007.
- [17] WILLIAMS, Marcie R., Verónica AZCUTIA, Gail NEWTON, Pilar ALCAIDE a Francis W. LUSCINSKAS. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in Immunology* [online]. 2011, **32**(10), 461–469. ISSN 1471-4981. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2011.06.009
- [18] PRUENSTER, Monika, Liesbeth MUDDE, Paula BOMBOSI, Svetla DIMITROVA, Marion ZSAK, Jim MIDDLETON, Ann RICHMOND, Gerard J. GRAHAM, Stephan SEGERER, Robert J. B. NIBBS a Antal ROT. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nature Immunology* [online]. 2009, **10**(1), 101–108. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1675
- [19] KOLACZKOWSKA, Elzbieta a Paul KUBES. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2013, **13**(3), 159–175. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri3399
- [20] BROWN, E. J. Phagocytosis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* [online]. 1995, **17**(2), 109–117. ISSN 0265-9247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.950170206
- [21] KAMEN, Lynn A., Jonathan LEVINSOHN, Amy CADWALLADER, Susheela TRIDANDAPANI a Joel A. SWANSON. SHIP-1 increases early oxidative burst and regulates phagosome maturation in macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2008, **180**(11), 7497–7505. ISSN 0022-1767.

- [22] ALVAREZ, María Noel, Gonzalo PELUFFO, Lucía PIACENZA a Rafael RADI. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(8), 6627–6640. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.167247
- [23] TLILI, Asma, Sophie DUPRÉ-CROCHET, Marie ERARD a Oliver NÜSSE. Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. 2011, **50**(3), 438–447. ISSN 1873-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.024
- [24] DECOURSEY, T. E., V. V. CHERNY, D. MORGAN, B. Z. KATZ a M. C. DINAUER. The gp91phox component of NADPH oxidase is not the voltage-gated proton channel in phagocytes, but it helps. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(39), 36063–36066. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C100352200
- [25] DECOURSEY, Thomas E. The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase. *Immunological Reviews* [online]. 2016, **273**(1), 194–218. ISSN 1600-065X. Dostupné z: doi:10.1111/imr.12437
- [26] FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1995, **64**, 97–112. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- [27] SHENG, Yuewei, Isabel A. ABREU, Diane E. CABELLI, Michael J. MARONEY, Anne-Frances MILLER, Miguel TEIXEIRA a Joan Selverstone VALENTINE. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews* [online]. 2014, **114**(7), 3854–3918. ISSN 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr4005296
- [28] NORDENFELT, Pontus a Hans TAPPER. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2011, **90**(2), 271–284. ISSN 1938-3673. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0810457
- [29] THOMAS, E. L., M. B. GRISHAM a M. M. JEFFERSON. Cytotoxicity of chloramines. *Methods in Enzymology*. 1986, **132**, 585–593. ISSN 0076-6879.
- [30] WINTERBOURN, Christine C. a Anthony J. KETTLE. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2013, **18**(6), 642–660. ISSN 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2012.4827
- [31] PIACENZA, Lucía, Madia TRUJILLO a Rafael RADI. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2019, **216**(3), 501–516. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20181886
- [32] FAURSCHOU, Mikkel a Niels BORREGAARD. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*. 2003, **5**(14), 1317–1327. ISSN 1286-4579.
- [33] BAINTON, D. F. a M. G. FARQUHAR. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. *The Journal of Cell Biology*. 1968, **39**(2), 286–298. ISSN 0021-9525.
- [34] BAINTON, D. F. a M. G. FARQUHAR. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. *The Journal of Cell Biology*. 1968, **39**(2), 299–317. ISSN 0021-9525.

- [35] BORREGAARD, N., L. KJELDSSEN, K. RYGAARD, L. BASTHOLM, M. H. NIELSEN, H. SENDELØV, O. W. BJERRUM a A. H. JOHNSSEN. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 1992, **90**(1), 86–96. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI115860
- [36] GULLBERG, U., N. BENGTSSON, E. BÜLOW, D. GARWICZ, A. LINDMARK a I. OLSSON. Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*. 1999, **232**(1–2), 201–210. ISSN 0022-1759.
- [37] LOMINADZE, George, David W. POWELL, Greg C. LUERMAN, Andrew J. LINK, Richard A. WARD a Kenneth R. MCLEISH. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Molecular & cellular proteomics: MCP* [online]. 2005, **4**(10), 1503–1521. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M500143-MCP200
- [38] RØRVIG, Sara, Ole ØSTERGAARD, Niels H. H. HEEGAARD a Niels BORREGAARD. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2013, **94**(4), 711–721. ISSN 1938-3673. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.1212619
- [39] SENDELØV, H., L. KJELDSSEN a N. BORREGAARD. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1993, **150**(4), 1535–1543. ISSN 0022-1767.
- [40] SENDELØV, H., P. FOLLIN, L. KJELDSSEN, K. LOLLIKE, C. DAHLGREN a N. BORREGAARD. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1995, **154**(8), 4157–4165. ISSN 0022-1767.
- [41] FUCHS, Tobias A., Ulrike ABED, Christian GOOSMANN, Robert HURWITZ, Ilka SCHULZE, Volker WAHN, Yvette WEINRAUCH, Volker BRINKMANN a Arturo ZYCHLINSKY. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2007, **176**(2), 231–241. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200606027
- [42] WANG, Yanming, Ming LI, Sonja STADLER, Sarah CORRELL, Pingxin LI, Danchen WANG, Ryo HAYAMA, Lauriebeth LEONELLI, Hyunsil HAN, Sergei A. GRIGORYEV, C. David ALLIS a Scott A. COONROD. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2009, **184**(2), 205–213. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200806072
- [43] LI, Pingxin, Ming LI, Michael R. LINDBERG, Mary J. KENNETT, Na XIONG a Yanming WANG. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2010, **207**(9), 1853–1862. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20100239
- [44] PAPAYANNOPOULOS, Venizelos, Kathleen D. METZLER, Abdul HAKKIM a Arturo ZYCHLINSKY. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2010, **191**(3), 677–691. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201006052
- [45] METZLER, Kathleen D., Christian GOOSMANN, Aleksandra LUBOJEMSKA, Arturo ZYCHLINSKY a Venizelos PAPAYANNOPOULOS. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports* [online]. 2014, **8**(3), 883–896. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2014.06.044

- [46] KAMBARA, Hiroto, Fei LIU, Xiaoyu ZHANG, Peng LIU, Besnik BAJRAMI, Yan TENG, Li ZHAO, Shiyi ZHOU, Hongbo YU, Weidong ZHOU, Leslie E. SILBERSTEIN, Tao CHENG, Mingzhe HAN, Yuanfu XU a Hongbo R. LUO. Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Reports* [online]. 2018, **22**(11), 2924–2936. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.02.067
- [47] SOLLBERGER, Gabriel, Axel CHOIDAS, Garth Lawrence BURN, Peter HABENBERGER, Raffaella DI LUCREZIA, Susanne KORDES, Sascha MENNINGER, Jan EICKHOFF, Peter NUSSBAUMER, Bert KLEBL, Renate KRÜGER, Alf HERZIG a Arturo ZYCHLINSKY. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science Immunology* [online]. 2018, **3**(26). ISSN 2470-9468. Dostupné z: doi:10.1126/sciimmunol.aar6689
- [48] LEE, Warren L. a Sergio GRINSTEIN. The Tangled Webs That Neutrophils Weave. *Science* [online]. 2004, **303**(5663), 1477–1478. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1095484
- [49] YOUSEFI, S., C. MIHALACHE, E. KOZLOWSKI, I. SCHMID a H. U. SIMON. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2009, **16**(11), 1438–1444. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2009.96
- [50] YOUSEFI, Shida, Jeffrey A. GOLD, Nicola ANDINA, James J. LEE, Ann M. KELLY, Evelyne KOZLOWSKI, Inès SCHMID, Alex STRAUMANN, Janine REICHENBACH, Gerald J. GLEICH a Hans-Uwe SIMON. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine* [online]. 2008, **14**(9), 949–953. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.1855
- [51] MORSHED, Mahbulul, Ruslan HLUSHCHUK, Dagmar SIMON, Andrew F. WALLS, Kazushige OBATA-NINOMIYA, Hajime KARASUYAMA, Valentin DJONOV, Alexander EGDEL, Thomas KAUFMANN, Hans-Uwe SIMON a Shida YOUSEFI. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. 2014, **192**(11), 5314–5323. ISSN 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1303418
- [52] DWORSKI, Ryszard, Hans-Uwe SIMON, Aimee HOSKINS a Shida YOUSEFI. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *The Journal of allergy and clinical immunology* [online]. 2011, **127**(5), 1260–1266. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2010.12.1103
- [53] HONG, Cynthia, Yoko KIDANI, Noelia A-GONZALEZ, Tram PHUNG, Ayaka ITO, Xin RONG, Katrin ERICSON, Hanna MIKKOLA, Simon W. BEAVEN, Lloyd S. MILLER, Wen-Hai SHAO, Philip L. COHEN, Antonio CASTRILLO, Peter TONTONNOZ a Steven J. BENSINGER. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2012, **122**(1), 337–347. ISSN 1558-8238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI58393
- [54] SHI, J., G. E. GILBERT, Y. KOKUBO a T. OHASHI. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood*. 2001, **98**(4), 1226–1230. ISSN 0006-4971.
- [55] FELDMANN, M., F. M. BRENNAN a R. N. MAINI. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology* [online]. 1996, **14**, 397–440. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397

- [56] BRENNAN, FionulaM, Andrew JACKSON, David CHANTRY, Ravinder MAINI a Marc FELDMANN. INHIBITORY EFFECT OF TNF $\alpha$  ANTIBODIES ON SYNOVIAL CELL INTERLEUKIN-1 PRODUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *The Lancet* [online]. 1989, **334**(8657), 244–247. ISSN 0140-6736, 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(89)90430-3
- [57] HAWORTH, C., F. M. BRENNAN, D. CHANTRY, M. TURNER, R. N. MAINI a M. FELDMANN. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Immunology* [online]. 1991, **21**(10), 2575–2579. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.1830211039
- [58] BUTLER, D. M., R. N. MAINI, M. FELDMANN a F. M. BRENNAN. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *European Cytokine Network*. 1995, **6**(4), 225–230. ISSN 1148-5493.
- [59] SMOLEN, Josef S., Daniel ALETAHA, Marcus KOELLER, Michael H. WEISMAN a Paul EMERY. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [online]. 2007, **370**(9602), 1861–1874. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(07)60784-3
- [60] TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)*. 2000, **289**(5484), 1504–1508. ISSN 0036-8075.
- [61] SCHETT, Georg. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2007, **9**(1), 203. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/ar2110
- [62] MATSUSHIMA, K., K. MORISHITA, T. YOSHIMURA, S. LAVU, Y. KOBAYASHI, W. LEW, E. APPELLA, H. F. KUNG, E. J. LEONARD a J. J. OPPENHEIM. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine*. 1988, **167**(6), 1883–1893. ISSN 0022-1007.
- [63] PEVERI, P., A. WALZ, B. DEWALD a M. BAGGIOLINI. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1988, **167**(5), 1547–1559. ISSN 0022-1007.
- [64] SAMANTA, A. K., J. J. OPPENHEIM a K. MATSUSHIMA. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, **265**(1), 183–189. ISSN 0021-9258.
- [65] THELEN, M., P. PEVERI, P. KERNEN, V. VON TSCHARNER, A. WALZ a M. BAGGIOLINI. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1988, **2**(11), 2702–2706. ISSN 0892-6638.
- [66] ROGERS, G. E., H. W. HARDING a I. J. LLEWELLYN-SMITH. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1977, **495**(1), 159–175. ISSN 0006-3002.

- [67] BORISSOFF, Julian I., Ivo A. JOOSEN, Mathijs O. VERSTEYLEN, Alexander BRILL, Tobias A. FUCHS, Alexander S. SAVCHENKO, Maureen GALLANT, Kimberly MARTINOD, Hugo TEN CATE, Leonard HOFSTRA, Harry J. CRIJNS, Denisa D. WAGNER a Bas L.J.H. KIETSELAER. Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated with Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. 2013, **33**(8), 2032–2040. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.113.301627
- [68] FAN, L. Y., D. Y. HE, Q. WANG, M. ZONG, H. ZHANG, L. YANG a L. S. SUN. Citrullinated vimentin stimulates proliferation, pro-inflammatory cytokine secretion, and PADI4 and RANKL expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* [online]. 2012, **41**(5), 354–358. ISSN 1502-7732. Dostupné z: doi:10.3109/03009742.2012.670263
- [69] SONG, Shuzheng a Yingyan YU. Progression on Citrullination of Proteins in Gastrointestinal Cancers. *Frontiers in Oncology* [online]. 2019, **9** [vid. 2019-04-26]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2019.00015
- [70] RUS'D, A. A., Y. IKEJIRI, H. ONO, T. YONEKAWA, M. SHIRAIWA, A. KAWADA a H. TAKAHARA. Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse. *European Journal of Biochemistry*. 1999, **259**(3), 660–669. ISSN 0014-2956.
- [71] ISHIGAMI, Akihito, Takako OHSAWA, Hiroaki ASAGA, Kyoichi AKIYAMA, Masashi KURAMOTO a Naoki MARUYAMA. Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002, **407**(1), 25–31. ISSN 0003-9861.
- [72] CHAVANAS, Stéphane, Marie-Claire MÉCHIN, Hidenari TAKAHARA, Akira KAWADA, Rachida NACHAT, Guy SERRE a Michel SIMON. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* [online]. 2004, **330**, 19–27. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2003.12.038
- [73] KUBILUS, J., R. F. WAITKUS a H. P. BADEN. Partial purification and specificity of an arginine-converting enzyme from bovine epidermis. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 1980, **615**(1), 246–251. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2744(80)90027-3
- [74] TAKAHARA, H., Y. OIKAWA a K. SUGAWARA. Purification and characterization of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. *Journal of Biochemistry*. 1983, **94**(6), 1945–1953. ISSN 0021-924X.
- [75] JONES, Justin E., Corey P. CAUSEY, Bryan KNUCKLEY, Jessica L. SLACK-NOYES a Paul R. THOMPSON. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 2009, **12**(5), 616–627. ISSN 2040-3437.
- [76] FUHRMANN, Jakob, Kathleen W. CLANCY a Paul R. THOMPSON. Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation. *Chemical Reviews* [online]. 2015, **115**(11), 5413–5461. ISSN 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00003

- [77] TANIKAWA, Chizu, Martha ESPINOSA, Akari SUZUKI, Ken MASUDA, Kazuhiko YAMAMOTO, Eiju TSUCHIYA, Koji UEDA, Yataro DAIGO, Yusuke NAKAMURA a Koichi MATSUDA. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nature Communications* [online]. 2012, **3**, 676. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms1676
- [78] NAKASHIMA, K., T. HAGIWARA, A. ISHIGAMI, S. NAGATA, H. ASAGA, M. KURAMOTO, T. SENSU a M. YAMADA. Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, **274**(39), 27786–27792. ISSN 0021-9258.
- [79] ARITA, Kyouhei, Hiroshi HASHIMOTO, Toshiyuki SHIMIZU, Katsuhiko NAKASHIMA, Michiyuki YAMADA a Mamoru SATO. Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2004, **11**(8), 777–783. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb799
- [80] ARITA, Kyouhei, Hiroshi HASHIMOTO, Toshiyuki SHIMIZU, Michiyuki YAMADA a Mamoru SATO. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human peptidylarginine deiminase V. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 2003, **59**(Pt 12), 2332–2333. ISSN 0907-4449.
- [81] MÉCHIN, M.-C., M. SEBBAG, J. ARNAUD, R. NACHAT, C. FOULQUIER, V. ADOUE, F. COUDANE, H. DUPLAN, A.-M. SCHMITT, S. CHAVANAS, M. GUERRIN, G. SERRE a M. SIMON. Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2007, **29**(3), 147–168. ISSN 1468-2494. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00377.x
- [82] WANG, Shu a Yanming WANG. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2013, **1829**(10), 1126–1135. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2013.07.003
- [83] KEARNEY, Patricia L., Monica BHATIA, Nelroy G. JONES, Luo YUAN, Mary C. GLASCOCK, Kristen L. CATCHINGS, Michiyuki YAMADA a Paul R. THOMPSON. Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry* [online]. 2005, **44**(31), 10570–10582. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi050292m
- [84] KNUCKLEY, Bryan, Monica BHATIA a Paul R. THOMPSON. Protein arginine deiminase 4: evidence for a reverse protonation mechanism. *Biochemistry* [online]. 2007, **46**(22), 6578–6587. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi700095s
- [85] BURSKA, Agata N., Laura HUNT, Marjorie BOISSINOT, Rocky STROLLO, Brent J. RYAN, Ed VITAL, Ahuva NISSIM, Paul G. WINYARD, Paul EMERY a Frederique PONCHEL. Autoantibodies to posttranslational modifications in rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation* [online]. 2014, **2014**, 492873. ISSN 1466-1861. Dostupné z: doi:10.1155/2014/492873
- [86] TILVAWALA, Ronak, Son Hong NGUYEN, Aaron J. MAURAS, Venkatesh V. NEMMARA, Mitesh NAGAR, Ari J. SALINGER, Sunil NAGPAL, Eranthie WEERAPANA a Paul R. THOMPSON. The Rheumatoid Arthritis-Associated Citrullinome. *Cell Chemical Biology* [online]. 2018, **25**(6), 691-704.e6. ISSN 2451-9448. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2018.03.002



- [87] VAN STEENDAM, Katleen, Kelly TILLEMANS a Dieter DEFORCE. The relevance of citrullinated vimentin in the production of antibodies against citrullinated proteins and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* [online]. 2011, **50**(5), 830–837. ISSN 1462-0332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/keq419
- [88] WRIGHT, Helen L., Robert J. MOOTS a Steven W. EDWARDS. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology* [online]. 2014, **10**(10), 593–601. ISSN 1759-4804. Dostupné z: doi:10.1038/nrrheum.2014.80
- [89] LAMENSA, J. W. a M. A. MOSCARELLO. Deimination of human myelin basic protein by a peptidylarginine deiminase from bovine brain. *Journal of Neurochemistry*. 1993, **61**(3), 987–996. ISSN 0022-3042.
- [90] MASTRONARDI, Fabrizio G., Denise WOOD, Jiang MEI, Reinout RAIJMAKERS, Vivian TSEVELEKI, Hans-Michael DOSCH, Lesley PROBERT, Patrizia CASACCIA-BONNEFIL a Mario A. MOSCARELLO. Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* [online]. 2006, **26**(44), 11387–11396. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3349-06.2006
- [91] CHANG, Xiaotian, Jinxiang HAN, Li PANG, Yan ZHAO, Yi YANG a Zhonglin SHEN. Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC cancer* [online]. 2009, **9**, 40. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-9-40
- [92] LUO, Yuan, Kyouhei ARITA, Monica BHATIA, Bryan KNUCKLEY, Young-Ho LEE, Michael R. STALLCUP, Mamoru SATO a Paul R. THOMPSON. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* [online]. 2006, **45**(39), 11727–11736. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi061180d
- [93] JONES, Justin E., Jessica L. SLACK, Pengfei FANG, Xuesen ZHANG, Venkataraman SUBRAMANIAN, Corey P. CAUSEY, Scott A. COONROD, Min GUO a Paul R. THOMPSON. Synthesis and screening of a haloacetamide containing library to identify PAD4 selective inhibitors. *ACS chemical biology* [online]. 2012, **7**(1), 160–165. ISSN 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/cb200258q
- [94] PRIETO, Eloise I. a Kazuhiro MAESHIMA. Dynamic chromatin organization in the cell. *Essays In Biochemistry* [online]. 2019, EBC20180054. ISSN 0071-1365, 1744-1358. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180054
- [95] LUGER, K., A. W. MÄDER, R. K. RICHMOND, D. F. SARGENT a T. J. RICHMOND. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* [online]. 1997, **389**(6648), 251–260. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/38444
- [96] DAVEY, Curt A., David F. SARGENT, Karolin LUGER, Armin W. MAEDER a Timothy J. RICHMOND. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2002, **319**(5), 1097–1113. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(02)00386-8
- [97] OLINS, A. L. a D. E. OLINS. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science (New York, N.Y.)*. 1974, **183**(4122), 330–332. ISSN 0036-8075.
- [98] KORNBERG, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*. 1974, **184**(4139), 868–871. ISSN 0036-8075.

- [99] WOODCOCK, C. L., J. P. SAFER a J. E. STANCHFIELD. Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence. *Experimental Cell Research*. 1976, **97**, 101–110. ISSN 0014-4827.
- [100] THOMAS, J. O. The higher order structure of chromatin and histone H1. *Journal of Cell Science. Supplement*. 1984, **1**, 1–20. ISSN 0269-3518.
- [101] BEDNAR, Jan, Isabel GARCIA-SAEZ, Ramachandran BOOPATHI, Amber R. CUTTER, Gabor PAPAI, Anna REYMER, Sajad H. SYED, Imtiaz Nisar LONE, Ognyan TONCHEV, Corinne CRUCIFIX, Hervé MENONI, Christophe PAPIN, Dimitrios A. SKOUFIAS, Hitoshi KURUMIZAKA, Richard LAVERY, Ali HAMICHE, Jeffrey J. HAYES, Patrick SCHULTZ, Dimitar ANGELOV, Carlo PETOSA a Stefan DIMITROV. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Molecular Cell* [online]. 2017, **66**(3), 384-397.e8. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.04.012
- [102] PETERSON, Craig L. a Marc-André LANIEL. Histones and histone modifications. *Current biology: CB* [online]. 2004, **14**(14), R546-551. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2004.07.007
- [103] JENUWEIN, T. a C. D. ALLIS. Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2001, **293**(5532), 1074–1080. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1063127
- [104] DWIVEDI, Nishant a Marko RADIC. Citrullination of autoantigens implicates NETosis in the induction of autoimmunity. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. 2014, **73**(3), 483–491. ISSN 0003-4967, 1468-2060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2013-203844
- [105] SLADE, Daniel J., Venkataraman SUBRAMANIAN, Jakob FUHRMANN a Paul R. THOMPSON. Chemical and biological methods to detect post-translational modifications of arginine. *Biopolymers* [online]. 2014, **101**(2), 133–143. ISSN 1097-0282. Dostupné z: doi:10.1002/bip.22256
- [106] BIRON, Bethany M., Chun-Shiang CHUNG, Xian M. O'BRIEN, Yaping CHEN, Jonathan S. REICHNER a Alfred AYALA. Cl-Amidine Prevents Histone 3 Citrullination and Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Improves Survival in a Murine Sepsis Model. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2017, **9**(1), 22–32. ISSN 1662-8128. Dostupné z: doi:10.1159/000448808
- [107] COLÓN, David F., Carlos W. WANDERLEY, Marcelo FRANCHIN, Camila M. SILVA, Carlos H. HIROKI, Fernanda V. S. CASTANHEIRA, Paula B. DONATE, Alexandre H. LOPES, Leila C. VOLPON, Silvia K. KAVAGUTI, Vanessa F. BORGES, Cesar A. SPECK-HERNANDEZ, Fernando RAMALHO, Ana P. CARLOTTI, Fabio CARMONA, Jose C. ALVES-FILHO, Foo Y. LIEW a Fernando Q. CUNHA. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Critical Care* [online]. 2019, **23** [vid. 2019-05-08]. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-019-2407-8
- [108] FUHRMANN, Jakob a Paul R. THOMPSON. Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. *ACS Chemical Biology* [online]. 2016, **11**(3), 654–668. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.5b00942
- [109] ZHANG, Xiaozhu, Lily DING a Andrew J SANDFORD. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology* [online]. 2005, **6**, 4. ISSN 1471-2199. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2199-6-4

- [110] THÅLIN, Charlotte, Staffan LUNDSTRÖM, Cedric SEIGNEZ, Maud DALESKOG, Annika LUNDSTRÖM, Peter HENRIKSSON, Thomas HELLEDAY, Mia PHILLIPSON, Håkan WALLÉN a Mélanie DEMERS. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PloS One* [online]. 2018, **13**(1), e0191231. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0191231

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACPA – protilátky proti citrulinovaným proteinům

CaI – Calcium Ionophore A23187

CLP – metoda cekální ligace a punkce

IL – interleukin

LPS – lipopolysacharid

MBP – myelinový bazický protein

MPO – myeloperoxidasa

NE – neutrofilní elastasa

NETs – neutrofilní extracelulární pasti

NLS – jaderný lokalizační signál

OD – optická denzita

PAD – peptidylarginindeiminasa

PMA – forbol-12-myristát-13-acetát

PTM – post-translační modifikace

RA – revmatoidní artritida

ROS – reaktivní kyslíkové formy

TDFA – Thr-Asp-F-amidine

TNF – tumor nekrotizující faktor